

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



TESIS DOCTORAL

Desarrollo y diferenciación del epitelio tímico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esther Tobajas Morán

Directores

Juan José Muñoz Oliveira
Agustín G. Zapata González

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología



***Desarrollo y Diferenciación
del Epitelio Tímico***

Esther Tobajas Morán

2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología

***Desarrollo y Diferenciación
del Epitelio Tímico***

Esther Tobajas Morán

D. Juan José Muñoz Oliveira

Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia
Universidad Complutense de Madrid,

D. Agustín G. Zapata González

Departamento de Biología Celular
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid,

Certifican que Dña. Esther Tobajas Morán, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Biología de Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid el trabajo titulado: “Desarrollo y Diferenciación del Epitelio Tímico”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología.

Vº Bº directores

Fdo. Juan José Muñoz Oliveira

La interesada

Fdo. Agustín G. Zapata González

Fdo. Esther Tobajas Morán.

Agradecimientos

Después de unos cuantos añitos, por fin llegó el momento. Ahora al mirar atrás veo un camino que, aunque no ha sido un camino de rosas, ha estado cargado de buenos momentos que quedarán en mi memoria para siempre. Y por supuesto, lleno de personas que han hecho posible que sea así y a las que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar gracias a mi Director Agustín, por haber confiado en mí para formar parte de este proyecto y del equipo de gente tan estupenda que ha creado. Gracias por saber solucionar los problemas que han ido surgiendo a lo largo de estos años. Aún me acuerdo de aquellos inicios en los que supo “recolorcarme”, aunque nunca lo haya dicho, con mucho acierto. Gracias por todo lo que ha aportado para que este trabajo sea una realidad, por su minuciosidad y eficacia corrigiendo, y por permitirme con ello aprender de su gran experiencia.

Por supuesto gracias a mi Director Juanjo, por muchas cosas. La primera por haberme dado una oportunidad hace ya tiempo, aún cuando el momento no era el más adecuado. Por haber compartido conmigo gran parte de sus conocimientos e ideas, lo que ha hecho posible la realización de este manuscrito. Por dedicarle tanto tiempo y esfuerzo a este trabajo, que siento tan suyo como mío. Por haberme enseñado gran parte de los conocimientos científicos con los que cuento ahora, exprimiéndole el máximo jugo a todo, por cierto, con soberana paciencia y sin tener prisa nunca, aunque realmente la tuviera. Además, gracias por su trato cercano, por las muchas charlas científicas y no científicas y por las muchas risas (y no tan risas) compartidas a lo largo de todos estos años, en los que me ha escuchado y aguantado. Me llevo un montón enorme de buenos momentos de todo este tiempo en el que hemos trabajado juntos.

A Tere, por las muchas horas de trabajo juntas en las que su colaboración directa me ha enseñado un montón de cosas, científicas y no científicas, que han hecho que compartir parte de los años de este trabajo a su lado hayan sido un gustazo. Por su gran disposición siempre para echar una mano y por su ilusión y alegría al ir viendo como este trabajo tomaba forma. Por las charlas de ánimo y comprensión que me han permitido ver que siempre se puede. Por las palabras también de ánimo desde su experiencia no sólo a mí, sino también a los más cercanos, que han hecho las cosas mucho más fáciles.

A todos mis compañeros del CAI, muchas gracias por hacer que trabajar aquí haya sido un lujo. Soy afortunada de poder decir que me he sentido como en “casa”, ya que además de las muchas horas compartidas siempre me he sentido arropada por todos. A Carmen, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo, tanto en la fase experimental como en sus consejos sobre el manuscrito, por las muchas veces que se ha asomado a la puerta para “mandarnos a trabajar” y

“piropearnos” (jaja!), sacándome una sonrisa y haciendo mucho más llevaderos los días de trabajo. A Amalia, por su cariño incondicional que no tengo palabras para agradecer, cargado siempre de palabras de apoyo y por sus valiosos consejos, que han sido un empujón enorme para coger fuerzas. A Alfonso, por irradiar esa paz y tranquilidad con su carácter y conseguir que se te contagie, por sus palabras cariñosas que siempre me han calado. A Luis, por su cercanía y su apoyo de todo tipo, que me han ayudado también en muchos momentos de este trabajo. Además a los dos muchas gracias por vuestra ayuda con la microscopía. A Carlos, por darle un punto de alegría y risas a la última etapa, que me han hecho desconectar en muchos momentos. A Paula, por empezar siendo una compañera con la que fue muy fácil trabajar desde el primer día y haberse convertido con el tiempo en una amiga y un gran apoyo. Por tantos buenos momentos, siempre colaboradora, tanto dentro como fuera del labo. Por su cariño y confianza, y sobre todo, mucho ánimo en lo que te queda!! A Miguel, otro tanto, por ayudarme a relativizar las cosas y transmitirme su tranquilidad. Por sus consejos de todo tipo y por sacar un buen rato de cada día, me llevo también un amigo mexa. A ti también mucho ánimo!! A Sonia, por renovar los aires del labo y permitirme ilusionarme con otras cosas en la fase de escritura.

A la gente de Medi, también mucho que agradecer. Aún me acuerdo de aquellos inicios en los que me acogisteis con los brazos abiertos. A Eva Jiménez por darme la oportunidad en su momento y por haberme enseñado tantas cosas desde cero con paciencia y cariño. A Nines y Alberto, gracias por su cercanía desde el primer momento, y por sus valiosos y sabios consejos. A Rosa, por las ganas y energía que le pone a todo, siempre con una sonrisa. A los “chicos” de medi, mis primeros compis de labo, a todos por su ánimos constantes, pero además a cada uno lo suyo. A Victor, por su carácter tan genial e inigualable que siempre te hace reír. A Laura, por su dulzura y sus palabras siempre cariñosas. A Jaris, por estar siempre dispuesta a ayudar en lo que pueda y por su apoyo. Ha sido un placer veros leer la Tesis a los tres. A Ana, dentro de nada te toca a ti, ánimo!

A Javier y David, gracias por todo lo que me enseñaron al principio. A Sara, ánimo a ti también, ya queda menos.

Al personal del animalario de las Facultades de Medicina y Biología de la UCM (Eva, Estela, Verónica, Antonio, ...), por haberse ocupado del mantenimiento de los ratones necesarios para este trabajo durante todos estos años.

Al Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología y al Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM, por haberme permitido y puesto siempre fácil realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mis amigos, no puedo mencionarlos uno a uno pero todos sabréis quienes sois. A la “enzima epitelial” (jaja!), por los buenos momentos compartidos y por darme las fuerzas que necesitaba con sus palabras, a los cuatro millones de gracias. Al “grupillo” de Getafe, por su apoyo durante el proceso y su alegría al ver que esto llegaba al final. A la gente de Torrejón, por interesarse siempre por como iba, a veces una pregunta vale millones. A las mañicas, por su apoyo a distancia pero no menos importante. A David y Felix, por sus ánimos y cariño, cada uno a su manera, pero los dos de valor incalculable. A Eva, por apoyarme y entenderme en todo y hacerme saber que puedo contar con ella. Especialmente gracias a Elena, por estar siempre ahí para todo desde hace tanto tiempo, no hay palabras para agradecerlo.

A mi toda mi familia, tíos y primos, por interesarse siempre por mi trabajo, animándome a llegar hasta el final. Especialmente a mi abuela, por tener ese corazón tan grande y porque sólo ver su cara al ver la Tesis ha hecho que todo mereciera la pena.

A mis padres, porque esto sin ellos habría sido imposible. Por apoyarme y ayudarme siempre, en todas las circunstancias. Por enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia. Por entenderme en muchos momentos de estrés y por hacer tuyas mis alegrías. Y sobre todo gracias por creer siempre en mí, porque eso ha hecho todo posible. A mi hermana y Javi, por haber sido un pilar fundamental todos estos años y por su enorme apoyo, ánimos y ayuda inestimable y enhorabuena en esta nueva etapa que ya llega! A mi hermana, hay cosas que merecen una mención especial pero no se pueden expresar con palabras, simplemente gracias por estar siempre a mi lado. Os quiero.

A Víctor, imposible resumir aquí todo lo que le debo. Gracias por ser mi mayor apoyo y por escucharme hasta la saciedad todos los días con una inmensa paciencia. Por hacer por mí cosas de un valor sentimental incalculable que, entre otros muchos aspectos, han hecho posible este trabajo. Por acompañarme en los malos momentos, haciéndome relativizar todo, y por disfrutar conmigo de los buenos, haciéndolos inmensamente mejores. Por esperarme tanto tiempo sin poner nunca una mala cara y por confiar siempre en que podía, sin dudar ni una sola vez de mí. Y sobre todo, gracias por estar a mi lado, por hacerme feliz y por querer compartir tu vida conmigo. Te quiero.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxyrribonucleico
AIRE	Regulador Autoimmune
APCs	Células presentadoras de antígenos
Balb/c	Balb/c (background genético)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
C57Bl6	Black 6 (background genético)
CD1	CD1 (background genético)
Cld3/4	Claudinas 3/4
cTEC	Célula epitelial tímica cortical
cTEP	Progenitor epitelial tímico cortical
DC	Célula dendrítica
Dll4	Delta Like 4
DMSO	Dimetilsufóxido
DN	Doble negativa (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DP	Doble positiva (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
dpc.	Días postcoito
E-cad	E-cadherina
EDTA	Ácido etilendiaminatetracético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos

FoxN1	Forkhead box protein N1
FSC	Forward Scatter
FTOC	Cultivo orgánico de lóbulos tímicos fetales
hi	Altos niveles de expresión
Hoe	Hoechst
IL7	Interleucina 7
int	Niveles intermedios de expresión
K5	Queratina 5
K8	Queratina 8
KO	Knock Out
lo	Bajos niveles de expresión
LT	Linfotoxina
LTi	Lymphoid Tissue Inducer Cells
MHC	Molécula de Histocompatibilidad
mTEC	Célula epitelial tímica medular
mTEP	Progenitor epitelial tímico medular
MTS10/24	Mouse Thymic Stroma
NK	Célula Natural Killer
NNC	Células mesenquimales derivadas de la cresta neural
NSG	NOD SCID Gamma chain
Nude	Athymic Nude Mice
PanCK	Pancitoqueratina
PBS	Tampón Salino Fosfato
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa

PN	Postnatal
Rag	Recombination Activating gene
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RTOC	Cultivo orgánico reagregado de timo
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
SP	Simples positivas (CD4 o CD8)
SSC	Side Scatter
TA	Temperatura Ambiente
TCR	Receptor de las Células T
TEC	Célula Epitelial Tímica
TEP	Progenitor epitelial tímico
TSAs	Autoantígenos tisulares
UEA	Ulex Europaeus Agglutinin
<i>wt</i>	Wildtype

Índice

ÍNDICE

Introducción.....1

1. El timo, un órgano linfoide primario especializado en la diferenciación fenotípica y funcional de los linfocitos T	3
2. Corteza y médula, compartimentos epiteliales especializados en selección positiva y tolerancia, respectivamente.....	5
3. Organogénesis tímica	11
3.1. Determinación del endodermo faríngeo a timo: Organogénesis temprana	11
3.2. Diferenciación tímica: Organogénesis tardía	13
3.2.1. Expresión de FoxN1 y especificación del epitelio tímico	13
3.2.2. Diferenciación corteza/médula. Aparición de marcadores epiteliales funcionales	14
3.2.3. Colonización y desarrollo linfoide	20
3.2.4. Regulación del desarrollo tímico	22
3.2.4.1. FoxN1.....	22
3.2.4.2. Regulación de la determinación del linaje cortical-medular .	25
3.2.4.3. Regulación de la diferenciación cortical.....	26
3.2.4.4. Regulación de la diferenciación medular	27
4. Mecanismos de organogénesis/histogénesis y su relación con la diferenciación de las células epiteliales tímicas	29

Hipótesis y objetivos.....39

Material y métodos.....43

1. Animales de experimentación	45
1.1. Detección de los alelos mutantes	46
1.1.1. Aislamiento de ADN.....	46
1.1.2. PCR.....	47
2. Obtención de muestras y suspensiones celulares.....	47

2.1. Suspensiones de células epiteliales tímicas (TECs)	48
2.2. Conteo celular	48
3. Cultivos de lóbulos tímicos	48
3.1. Ensayos <i>in vitro</i> con lóbulos tímicos	48
3.1.1. Explantes de lóbulo completo en dos dimensiones	49
3.1.2. Explantes de fragmentos de lóbulos tímicos en tres dimensiones	49
3.2. FTOC tratados con factores de crecimiento	49
4. Análisis de las muestras	50
4.1. Caracterización citofluorimétrica de distintas poblaciones celulares	50
4.2. Análisis microscópico de criosecciones tímicas	50
4.2.1. Obtención de criosecciones	50
4.2.2. Inmunodetección microscópica	51
4.3. Inmunodetección sobre criosecciones histológicas gruesas	52
4.4. Inmunodetección sobre órgano completo (" <i>in toto</i> ")	53
4.5. Reconstrucciones tridimensionales a partir de criosecciones tímicas	53
4.6. Estudios de colocalización y cuantificación	54
ANEXO I	56
ANEXO II	57
ANEXO III	58
Resultados	61
1. Desarrollo del epitelio tímico en ausencia de FoxN1: Estudio de ratones <i>Nude</i>	63
1.1. El timo <i>Nude</i> postnatal es una estructura tubular ramificada y continua	63
1.2. El desarrollo del timo <i>Nude</i> implica un proceso de ramificación y formación de lumen	69
1.3. Cinética del desarrollo del timo <i>Nude</i> : ramificación, estratificación-desestratificación y formación de lumen	74

2. Desarrollo del epitelio tímico en presencia de FoxN1 pero ausencia de colonización linfóide: Estudio de timos de ratones <i>NSG</i> e <i>Ikaros</i> <i>-/-</i>	103
2.1. El timo de ratones <i>NSG</i> postnatales presenta algunas características similares a las observadas en el de ratones <i>Nude</i>	104
2.2. La presencia de FoxN1 inhibe el proceso de diferenciación apical y desestratificación observado en el timo <i>Nude</i>	110
3. Desarrollo de un epitelio tímico FoxN1+ tras su colonización linfóide postnatal: Estudio de ratones <i>Ikaros</i> <i>-/-</i> postnatales	163
3.1. La expresión de marcadores funcionales de epitelio medular depende de la presencia de células linfoides en el timo	163
4. Desarrollo del epitelio tímico en condiciones normales: Estudio de ratones <i>wildtype</i>	180
4.1. La estructura histológica córtico/medular de los timos <i>wildtype</i> , responde a un patrón de morfogénesis ramificada, y la adquisición de funcionalidad medular ocurre durante el periodo fetal como la observada en timos alíntoides colonizados postnatalmente	180
5. Los lóbulos tímicos tempranos se comportan <i>in vitro</i> de acuerdo a un modelo de organogénesis ramificada	200
5.1. Lóbulos tímicos tempranos mantenidos en cultivos bi y tridimensionales generan estructuras donde la polarización de los marcadores concuerda con la descrita <i>in situ</i> durante la organogénesis ramificada	200
5.2. La expresión de FoxN1 inhibe la respuesta de los lóbulos tímicos en cultivo orgánico al aporte exógeno de factores de crecimiento recuperándose en presencia de precursores linfoides	205

Discusión	209
1. El desarrollo tímico está basado en un fenómeno de inhibición de la tubulogénesis.....	212
1.1. El desarrollo del timo <i>Nude</i> responde a un proceso de tubulogénesis y morfogénesis ramificada	212
1.2. La expresión de FoxN1 provoca un bloqueo parcial del proceso de tubulogénesis en el timo	216
2. La expresión de FoxN1 determina conjuntamente la inhibición de la tubulogénesis y la activación de un programa genético cortical que resultan en la especificación de la corteza y la médula tímicas	218
3. Papel de las células linfoides. Diferenciación de médula y maduración de corteza y médula	226
4. Desarrollo fetal del epitelio tímico vs renovación postnatal	231
Conclusiones	233
Bibliografía	237
Summary.....	261
ANEXO IV	271

Introducción

1. El timo, un órgano linfoide primario especializado en la diferenciación fenotípica y funcional de los linfocitos T.

El timo es un órgano linfoide primario de origen epitelial encargado de la producción y el mantenimiento de los linfocitos T funcionalmente maduros (*Romano y cols., 2013*). Además, el órgano tiene capacidad para diferenciar otras líneas hematopoyéticas, de manera que los precursores que entran en el timo mantienen la capacidad para generar otros linajes como células dendríticas (DCs) y células natural killers (NKs) (*Barcena y cols., 1994; Sanchez y cols., 1994*). A medida que los precursores van diferenciando hacia célula T pierden este potencial multipotente y la expresión de los genes necesarios para generar los otros linajes, regulando positivamente la de genes específicos del linaje T (*Rothenberg y cols., 2008*). El precursor definitivamente comprometido se desarrolla adquiriendo la funcionalidad de la célula T madura, que implica el reconocimiento de antígenos no propios a través del receptor antigénico (TCR) y su falta de reacción a los antígenos propios. La variabilidad del TCR, que determina que el pool de timocitos T maduros reaccione ante multitud de antígenos viene determinada por procesos de recombinación y variación somática de los genes que constituyen las cadenas β y α del receptor, de forma que, finalmente, cada célula expresa un único receptor específico y diferente al resto (*Siu y cols., 1984; Yanagi y cols., 1984; Thomas y cols., 2009*). A partir de esta generación aleatoria del pool de receptores antigénicos, se seleccionarán aquellos TCRs que resulten funcionales, es decir, que reconozcan antígenos presentados en el contexto del MHC propio y que no reconozcan antígenos propios, lo que se consigue mediante los denominados procesos de selección positiva y negativa.

El compromiso definitivo a linaje T de los progenitores linfoides que colonizan el timo lo determina el reordenamiento y expresión de la cadena β del TCR, que tiene lugar en el compartimento doble negativo, DN ($CD4^-CD8^-$) que se subdivide en cuatro subpoblaciones atendiendo a la expresión de los marcadores CD44 y CD25 (fig. 1) (*Godfrey y cols., 1993*): $CD44^+CD25^-$ (DN1), $CD44^+CD25^+$ (DN2), $CD44^-CD25^+$ (DN3) y $CD44^-CD25^-$ (DN4) y cursa con proliferación celular. Posteriormente, las células progresan al estadio de células doble positivas, DP ($CD4^+CD8^+$), donde se produce el reordenamiento de la cadena α del TCR y el cese de las recombinaciones $V\beta DJ\beta$ en el

locus TCR β (Malissen y cols., 1992). Con la expresión del complejo TCR $\alpha\beta$ en el estadio DP, se inicia el proceso de selección positiva, de forma que las células con receptores capaces de interactuar con el MHC propio son seleccionadas positivamente al recibir señales de activación desde el epitelio, lo que induce, entre otras cosas, la regulación positiva del marcador CD69 (Schoorman y cols., 1989). A partir de este momento, los timocitos perderán la expresión de CD4 o de CD8, convirtiéndose así en células CD4 SP o CD8 SP (simples positivas) y sufrirán un nuevo control, la selección negativa (fig. 1). A través de ésta, todas las células que hayan sido seleccionadas positivamente pero que reconozcan antígenos propios con alta afinidad/avidez serán eliminadas mediante señales apoptóticas enviadas desde el epitelio y las DCs (Sebzda y cols., 1999; Aliahmad y Kaye, 2006; Siggs y cols., 2006).

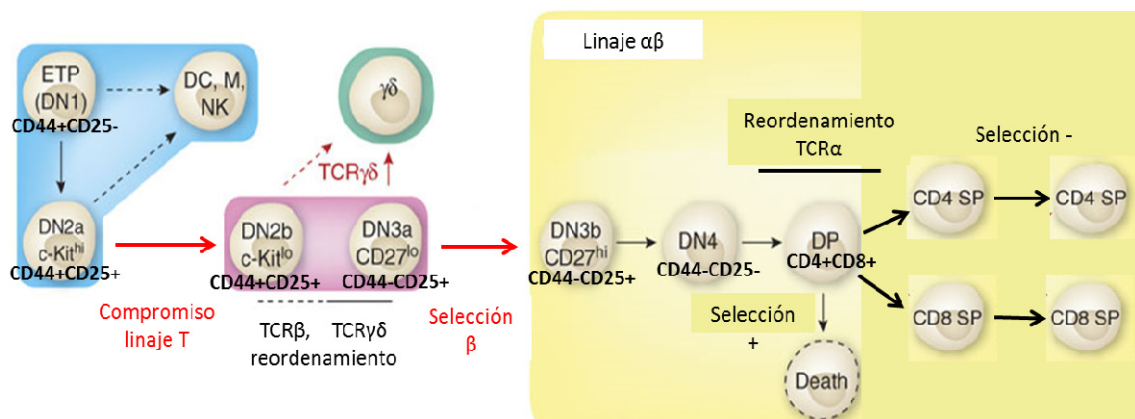


Figura 1. Esquema de la diferenciación de los timocitos TCR $\alpha\beta$ ⁺ en el timo de ratón. Estadios de diferenciación y expresión de marcadores en células del linaje T. En azul, progenitores tempranos no comprometidos, en morado, células comprometidas con el linaje T antes de la separación de los linajes $\alpha\beta$ (amarillo) y $\gamma\delta$ (verde). Adaptado de Carpenter y Bosselut (2010); Shah y Zuniga-Pflucker (2014).

Este proceso de diferenciación T implica regulación de la expresión génica, mediada por diferentes factores de transcripción y moduladores de la misma (Dias y cols., 2008), así como por procesos de proliferación y muerte celular. La activación y silenciamiento de distintos factores de transcripción no es autónoma, sino que está dirigida por diferentes señales procedentes del estroma tímico, fundamentalmente de las células epiteliales, y conlleva la modulación de la expresión de los genes necesarios

para dejar de responder a unas señales y comenzar a responder a otras diferentes. En definitiva, el proceso de desarrollo tímico está gobernado por la acción secuencial de diferentes redes génicas. Entre las señales que intervienen en la inducción de la diferenciación, se encuentran moléculas solubles como interleucinas (*Anderson y cols., 2006*) o morfógenos (*Varas y cols., 2003*) y señales dependientes de contactos célula-célula como los mediados por Notch y sus ligandos (*Ciofani y cols., 2004; Ciofani y cols., 2006; Ciofani y Zuniga-Pflucker, 2006; Laky y Fowlkes, 2008*) o la propia interacción TCR-MHC (*Weerkamp y cols., 2006; Salmond y cols., 2009*). Este intercambio de señales o crosstalk que se establece entre epitelio y timocitos en desarrollo está determinado por el carácter tridimensional de la red epitelial tímica, que maximiza las interacciones linfo-estromales, lo que resulta clave no solo para la diferenciación de los timocitos, sino también, al menos durante el desarrollo fetal, para la maduración del epitelio que ocurre en paralelo. Ésta es una característica única de la diferenciación de los linfocitos T que no requieren otras células linfoides como linfocitos B o células NKs (*Dorshkind, 1990*). Por otra parte, implica una organización histológica del timo en dominios especializados que permite la diferenciación secuencial de los timocitos.

2. Corteza y médula, compartimentos epiteliales especializados en selección positiva y tolerancia, respectivamente.

Esencialmente el timo está compartimentalizado en dos áreas histológicamente distintas denominadas corteza y médula con una zona de transición entre ambas, el borde o límite córtico-medular. Se asume, aunque no está determinado con exactitud, que, a su vez, ambos compartimentos están compuestos por diferentes nichos o microambientes específicos.

En el timo adulto los progenitores linfoides provenientes de la médula ósea alcanzan el órgano a través de los vasos del borde córtico-medular (*Lind y cols., 2001*), en respuesta a distintos factores entre los que se incluyen la demanda de células T desde los órganos linfoides periféricos (*Gossens y cols., 2009*) y, en relación con ella, la salida del órgano de los linfocitos maduros (*Schnell y cols., 2006*) y la disponibilidad de

nichos en el estroma tímico (*Prockop y Petrie, 2004*). Dentro del órgano, la proliferación y maduración de los timocitos en desarrollo requiere señales proporcionadas por los distintos compartimentos tímicos, con lo que dicha maduración conlleva la migración de los timocitos por todo el parénquima del órgano (*Petrie, 2003; Petrie y Zuniga-Pflucker, 2007*).

Dentro del timo, los precursores más tempranos DN1, se localizan en el borde córtico-medular (fig. 2). Estas células tienen capacidad para generar los linajes NK, DC y T, y su mantenimiento y expansión depende de factores como IL7, FLT3 o cKit. Migran como células DN2 a la zona subcapsular (*Lind y cols., 2001; Porritt y cols., 2003*) atraídos por gradientes de quimiocinas establecidos en la corteza para las que expresan receptores como CXCR4, CCR7 y CCR9 (*Benz y cols., 2004*) (fig. 2). En el estadio DN2 se regula positivamente la expresión de genes específicos del linaje T, entre ellos la de Rag (*Wilson y cols., 1992*), reordenándose los loci TCR γ y TCR δ y perdiéndose, en la transición DN2a-DN2b, la capacidad de generar otros linajes no T. La llegada de las células DN a la corteza externa coincide con el estadio DN3 y las primeras reordenaciones V β DJ β en el locus TCR β (fig. 2). Si dichas reordenaciones no son productivas, la célula muere. El tránsito a DN4 coincide con la expresión intracelular de TCR β , de manera que las células que han tenido un reordenamiento adecuado se unen a una cadena subrogada pre-TCR α , constituyendo el complejo pre-TCR (fig. 2). Hasta ese momento, la selección de linajes depende, esencialmente, de las señales transmitidas por Notch, pero tras el inicio de la señalización mediada por el pre-TCR, la expresión de genes target de Notch se regula negativamente y la señal predominante para la diferenciación T pasa a ser la del TCR. Se ha demostrado que el borde corticomedular constituye un microambiente rico en Notch e IL7, otra molécula implicada en estos primeros estadios de la diferenciación T (*Alves y cols., 2009a; Alves y cols., 2009b*). Ni en la corteza profunda ni en la externa se ha logrado definir una población de células epiteliales implicada específicamente en el mantenimiento de los timocitos en el estadio DN2. Aunque en el epitelio subcapsular tampoco se han identificado marcadores funcionales o moléculas señalizadoras determinantes para estos estadios de la diferenciación T más allá de algunas implicadas en la migración de los timocitos, sí se asume que la zona subcapsular pudiera constituir un microambiente especializado dentro de la corteza (*Lind y cols., 2001*).

Como ya se ha comentado, aunque Notch también participa en la determinación de linaje CD4/CD8, a partir de la expresión del TCR la señal dominante en la diferenciación T es la mediada por el propio receptor antigénico, con el fin de asegurar su funcionalidad y evitar la autoreactividad. La mayor parte del epitelio tímico está, por tanto, especializado en esta función y para ello, tiene capacidad de procesamiento y presentación antigénica tanto en el contexto de clase I como en el de clase II. A diferencia de otras células presentadoras, en el caso del epitelio tímico los antígenos procesados y presentados en el contexto de clase II, son antígenos sintetizados por la propia célula y procesados según un proceso de autofagia en lugar de fagocitosis, como ocurre con las células presentadoras profesionales (*Nedjic y cols., 2008*). Los dos procesos determinantes de la función de las células T: la generación de un amplio repertorio de TCRs funcionales y la tolerancia a lo propio, se producen de manera secuencial; de forma que el epitelio cortical está principalmente especializado en la selección del repertorio TCR funcional y la médula en la generación de la tolerancia central.

Al final del estadio DN4 comienzan las reordenaciones de la cadena TCR α y se induce la regulación positiva de CD4 y CD8, al tiempo que los timocitos comienzan la migración hacia la médula, ocupando las células la zona interna de la corteza que contiene, esencialmente timocitos DP (*Penit, 1988*) (fig. 2), la población linfoide mayoritaria de la corteza. En la mayor parte de la corteza se produce, por tanto, la selección positiva de los timocitos DP que han formado un TCR $\alpha\beta$. Los TCR que muestran avidéz intermedia por los complejos péptido-MHC propio reciben señales de rescate por parte del epitelio cortical que les permiten diferenciar a células SP (fig. 2), por tanto, los linfocitos maduros sólo expresan uno de los dos correceptores, y constituyen dos linajes funcionales: células SP CD4+, en su inmensa mayoría T colaboradoras, restringidas a interactuar con péptidos presentados por MHC de clase II, y células SP CD8+, citotóxicas que lo hacen con antígenos presentados en el contexto de clase I. La especialización de la corteza tímica en este proceso consiste básicamente en que las cTECs, además de la maquinaria molecular de otras células presentadoras de antígenos (APCs) y mTECs para el procesamiento antigénico, presentan una forma de procesamiento específico, distinto (*Klein y cols., 2014*). Por un

lado, las cTECs expresan un proteosoma que contiene una subunidad catalítica $\beta 5t$ ($\beta 5$ -thymus) que no se expresa en APCs profesionales ni mTECs (Murata y cols., 2007) y tienen una actividad peptidasa distinta de la de cualquier otro proteosoma, produciendo péptidos propios de alta afinidad por las moléculas de clase I del MHC (Ripen y cols., 2011). Ratones deficientes en dicha subunidad muestran una importante reducción en la proporción de timocitos CD8+, pero no en la de CD4+, y además, un pequeño porcentaje de células CD8+ seleccionadas positivamente tienen alteraciones en sus respuestas a distintos estímulos (Murata y cols., 2007; Nitta y cols., 2010).

En el caso del procesamiento antigénico en el contexto de clase II, las cTECs expresan también moléculas distintas al resto de células presentadoras, como son Prss16 (una proteína lisosomal), TSSP (Tissue Specific Serine Protease) (Tanaka y Taniuchi, 2014) y catepsina L (Gommeaux y cols., 2009; Viret y cols., 2011) en lugar de catepsina S, que es la de expresión mayoritaria en el resto de células presentadoras y mTECs. Por tanto, también en el contexto de clase II las células epiteliales corticales presentan péptidos diferentes a los de la médula y el resto de células presentadoras. Teniendo en cuenta que en ambos casos se trata de antígenos propios expresados por las propias cTECs y no captados por fagocitosis, su procesamiento diferencial es una forma de evitar presentar los mismos péptidos propios que el resto del organismo. Esto, junto con la selección positiva de TCRs con avidéz intermedia, parece importante para generar un amplio repertorio con capacidad de reacción frente a péptidos ajenos y evitar la selección positiva de clones autoreactivos que luego tuvieran que ser eliminados. Actualmente se considera que, además, estos péptidos específicos de la corteza tímica presentan características que los hacen especialmente idóneos para la selección positiva y la generación de un amplio repertorio funcional, como sugiere el que el repertorio generado por ratones deficientes en $\beta 5t$ no sólo es menor, sino que los clones generados resultan aparentemente menos eficaces (Nitta y cols., 2010).

Las interacciones péptidos-MHC-TCR $\alpha\beta$, que como se ha comentado permiten seleccionar positivamente los timocitos CD4+ y CD8+, regulan positivamente también la expresión de CCR7 en aquellos que son, finalmente, seleccionados, lo que les permite dejar la corteza tímica y migrar a la médula atraídos por sus ligandos, CCL19 y CCL21 expresados por las mTECs (Ueno y cols., 2004; Nitta y cols., 2009) (fig. 2).

Una vez en la médula, los timocitos seleccionados en la corteza sufren selección negativa, que genera el repertorio T definitivo capacitando a los linfocitos T para reconocer y responder a antígenos no propios y no hacerlo frente a los propios. La generación de esta tolerancia inmunológica central está gobernada por mTECs y DCs medulares. Las mTECs expresan múltiples antígenos propios titulares (TSAs) que esta vez son procesados como en la periferia y presentados a las células T, bien directamente por las propias mTECs o indirectamente con el concurso de DCs (Hubert y cols., 2011). Mediante este proceso, las células T que reconozcan antígenos propios con alta afinidad son eliminadas y las restantes abandonan el timo (fig. 2). Una parte esencial del proceso de selección negativa se centra, por tanto, en la capacidad de las mTECs de expresar antígenos de todos los tejidos del organismo lo que se debe, en parte, al factor de transcripción AIRE, un regulador de la autoinmunidad (Derbinski y cols., 2001; Mathis y Benoist, 2009).

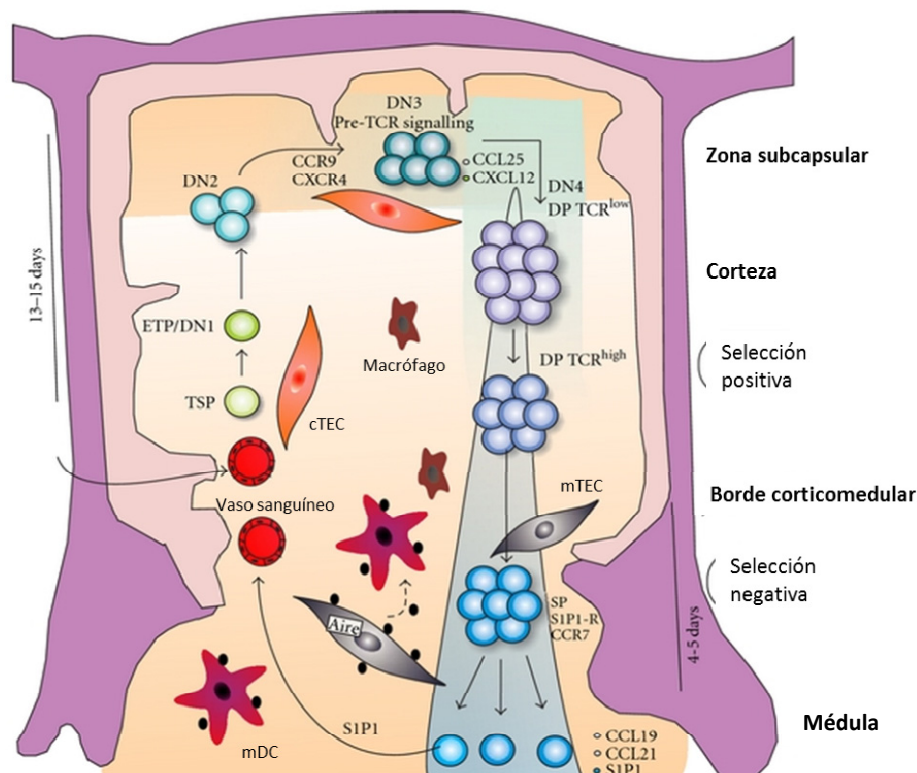


Figura 2. Esquema de las diferentes etapas de la diferenciación T en relación a su posición en el timo y algunas de las señales de maduración más importantes recibidas. TSP: thymus settling progenitors. ETP: early T cell progenitors. Adaptado de Meis y cols. (2012).

El proceso de selección negativa es, con todo, complicado y aún no se conoce en detalle. Sólo un pequeño número de mTECs expresa un set de TSAs dado (*Palmer, 2003; Derbinski y cols., 2008*) por lo que, posiblemente, los timocitos se mueven por la médula durante 4-5 días para interaccionar con todos los TSAs (*Rooke y cols., 1997*). También sólo un pequeño porcentaje de las mTECs expresa AIRE por lo que las mTECs AIRE- también podrían captar antígenos de las AIRE+. Por otro lado, las mTECs expresan otros TSAs de manera AIRE independiente (*Anderson y cols., 2002; Derbinski y cols., 2005*), que son mucho más frecuentes que los que se producen de forma dependiente del factor de transcripción (*Smith y cols., 1997*). Estos antígenos podrían ser un reflejo de la transcripción “des-reprimida” que sucede en mTECs en diferenciación terminal (*Derbinski y cols., 2005*), aunque otros resultados sugieren que son expresados en mTECs menos maduras (*Dooley y cols., 2009*). Otros autores han apuntado que algunos TSAs podrían ser consecuencia de la transcripción de genes “irrelevantes” durante la diferenciación epitelial (*Gillard y Farr, 2005; Gillard y cols., 2007; Dooley y cols., 2008; Dooley y cols., 2009*). Por ejemplo, el epitelio traqueal y el esofágico expresan paratohormona y calcitonina, dos TSAs expresados en el epitelio tímico de manera independiente de AIRE (*Dooley y cols., 2009*). Además de esta capacidad de producir TSAs, otra especialización de las mTECs es la respuesta que generan, ya que, en este caso, la interacción de alta afinidad TCR-Péptido-MHC no induce la activación de la célula T sino su muerte.

La participación de las DCs en este proceso se inicia con su llegada a la médula tímica atraídas por linfotactina (XCL1) producida de manera AIRE dependiente por las mTECs. Como las DCs no expresan AIRE no pueden, por tanto, generar TSAs, por lo que los captan vía fagocitosis de mTECs apoptóticas, procesándolos y presentándolos también a los timocitos (*Klein y cols., 2009; Koble y Kyewski, 2009*).

Por otra parte, no todos los clones T autoreactivos son eliminados, sino que una parte son diferenciados a células T reguladoras (Treg), también con el concurso de mTECs y DCs (*Pignata y cols., 1996a; Roman y cols., 2010; Klein y Jovanovic, 2011; Lei y cols., 2011*), que actúan en periferia suprimiendo los linfocitos T autoreactivos que hubieran podido escapar a la tolerancia central tímica, en lo que se denomina tolerancia dominante. Se conoce poco acerca de qué condiciona la decisión entre muerte y diferenciación a Treg. Sabemos que DCs y mTECs contribuyen dentro del

timo a la generación de Treg y, aparentemente, es necesaria una avidéz intermedia por el TCR entre la que determina selección positiva y la que induce delección clonal. Se desconoce si existe una población del estroma medular especializada en la diferenciación de Treg.

3. Organogénesis tímica.

El timo deriva del endodermo faríngeo, que en un momento del desarrollo embrionario se regionaliza en distintos arcos faríngeos. Determinadas zonas del endodermo se evaginan hacia el exterior formando las bolsas faríngeas que contactan con el ectodermo que, a su vez, se invagina formando las hendiduras faríngeas. Entre ellos se definen los denominados arcos faríngeos que se diferenciarán a distintos linajes: en el ratón, la primera bolsa faríngea dará las mandíbulas, la segunda las amígdalas y la tercera el paratiroides y el primordio epitelial tímico (*Grevellec y Tucker, 2010*).

La maduración del primordio epitelial tímico ocurre en dos etapas: una primera u organogénesis temprana en la que se induce y evagina el epitelio endodérmico de la tercera bolsa faríngea, independiente de la expresión de FoxN1, un factor de transcripción imprescindible para la segunda etapa en la que se organiza y diferencia el epitelio tímico (*Nehls y cols., 1996; Romano y cols., 2013*). Mientras que en la primera fase se producen interacciones epitelio-mesénquima, en la segunda predominan aquellas establecidas entre epitelio y células linfoides (*Rossi y cols., 2006*) que constituyen, junto con FoxN1, los reguladores principales del desarrollo tímico.

3.1. Determinación del endodermo faríngeo a timo: Organogénesis temprana.

En ratón, el primordio tímico se inicia hacia los 10,5 dpc., cuando células mesenquimales derivadas de la cresta neural (NNCs) determinan en el endodermo de la tercera bolsa faríngea el complejo timo-paratiroides con el concurso del tercer arco faríngeo (*Manley y Blackburn, 2003; Gordon y cols., 2004*). Distintos genes están

implicados en estos procesos, como Tbx1 (*Jerome y Papaioannou, 2001; Lindsay, 2001; Arnold y cols., 2006; Reeh y cols., 2014*), Pax1 (Paired box protein 1), Pax3, Pax9 (*Dietrich y Gruss, 1995; Su y Manley, 2000; Hetzer-Egger y cols., 2002*), Hoxa 3 (*Manley y Capecchi, 1995*), Eya1 (Eye absent homologue 1) y Six 1 (Sine oculis homeobox 1) (*Zou y cols., 2006*). Pax1 y Pax9, junto con Fgf8, parecen implicados en la determinación y el desarrollo de la tercera bolsa faríngea a 9,5 dpc. La evaginación y el crecimiento endodérmico, junto con su regionalización, ocurren a 11 dpc. y requieren el concurso de Hoxa3, Pax9, Eya1, Six1 y Noggin en un orden no del todo determinado. A 11,5 dpc. la expresión de Gcm2 determina el compromiso de la parte dorsal del primordio común con el paratiroides mientras FoxN1 determina en la parte distal el primordio tímico, manteniéndose el primordio común todavía unido a la cavidad faríngea (*Gordon y cols., 2001; Blackburn y Manley, 2004*) (fig. 3).

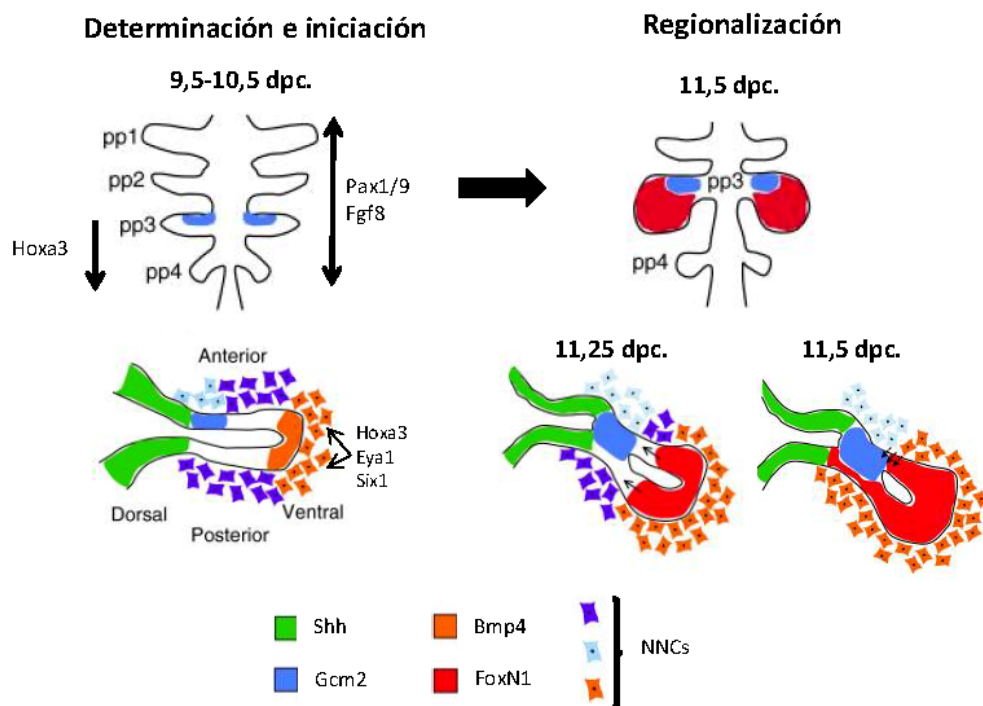


Figura 3. Determinación del endodermo faríngeo a timo. Organogénesis temprana a partir del endodermo anterior. Determinación del endodermo de la tercera bolsa faríngea que dará lugar al timo e iniciación del crecimiento a través de la activación de diferentes factores de transcripción por parte del endodermo y de las células de la cresta neural que envuelven el esbozo. Regionalización del esbozo especificada por la expresión de Gcm2 (paratiroides) y FoxN1 (timo). Adaptado de Gordon y Manley (2011).

3.2. Diferenciación tímica: Organogénesis tardía.

En la segunda etapa del desarrollo tímico, el primordio se separa de la cavidad faríngea y se produce la separación física de timo y paratiroides. A 12 dpc., aumenta la expresión de FoxN1 y se inicia la diferenciación (*Balciunaite y cols., 2002; Pongracz y cols., 2003; Blackburn y Manley, 2004*). La idea asumida actualmente es que el epitelio tímico se reorganiza, sus células pierden la polaridad, el lumen central se cierra con la participación de BMPs (*Gordon y cols., 2010*) y es colonizado por los primeros precursores linfoides, adquiriendo su típica estructura de red tridimensional, única entre los órganos epiteliales derivados del endodermo (*Penit y Vasseur, 1989; Itoi y cols., 2001; Masuda y cols., 2005*). El mesénquima circundante, proveniente del mesodermo y de las NNCs (*Le Douarin y Jotereau, 1975; Le Lievre y Le Douarin, 1975; Ge y Zhao, 2013*) se internaliza en el esbozo tímico generando las trabéculas conectivas del órgano. La entrada de los precursores linfoides y el aumento de la expresión de FoxN1 coinciden con los primeros pasos de la diferenciación de corteza y médula. Aparecen los primeros marcadores de ambos compartimentos y a partir de entonces se produce una diferenciación paralela e interdependiente de linfocitos T y epitelio tímico, expandiéndose primero el epitelio cortical y, posteriormente, el medular (*van Ewijk y cols., 2000*).

3.2.1. Expresión de FoxN1 y especificación del epitelio tímico.

Los mecanismos reguladores de la diferenciación inicial tímica no están del todo claros. Qué y cómo desencadena el programa genético que determina la diferenciación de una célula endodérmica a una célula epitelial con características únicas: capacidad para albergar y diferenciar progenitores linfoides, presentar antígenos procedentes de autofagia tanto con el concurso de MHC clase I como clase II, expresar autoantígenos, etc., sigue siendo un misterio. Sin embargo, se considera que de una u otra forma, FoxN1 juega un papel central en el proceso. FoxN1 pertenece a la familia de factores de transcripción Fox implicados en desarrollo, metabolismo, envejecimiento y cáncer (*Kaufmann y Knochel, 1996; Schorpp y cols., 1997*). En la vida

postnatal FoxN1 se expresa fundamentalmente en timo y epidermis (*Brissette y cols., 1996; Mecklenburg y cols., 2005*). Inicialmente, FoxN1 se expresa en la zona del primordio común timo-paratiroides que dará lugar al timo; posteriormente, a 12 dpc. su expresión aumenta, con lo que se promueve la diferenciación tímica (*Balciunaite y cols., 2002; Pongracz y cols., 2003; Blackburn y Manley, 2004*). En ausencia total de FoxN1 no hay diferenciación tímica alguna y en su lugar se genera un rudimento epitelial, cístico, incapaz de ser colonizado por precursores linfoides (*Bleul y Boehm, 2000*) en el que el epitelio no diferencia funcionalmente ni adquiere la capacidad de procesamiento y presentación antigénica o la expresión de TSAs. El resultado es un timo alinfoide, cístico que provoca una severa inmunodeficiencia T tanto en humanos como en ratón (*Nehls y cols., 1996; Pignata y cols., 1996b; Pignata, 2002; Su y cols., 2003*).

3.2.2. Diferenciación corteza/médula. Aparición de marcadores epiteliales funcionales.

En ratón, las células de los dos grandes compartimentos tímicos, corteza y médula, se distinguen por la expresión de distintos marcadores. Las cTECs se caracterizan por la expresión de K8/K18, ER-TR4, CDR1 o Ly51 (CD249) (CDR1 y Ly51 unen epítomos distintos del mismo antígeno) (*Gray y cols., 2002*), CD205 (DEC205) (*Shakib y cols., 2009*) y $\beta 5t$ (*Ripen y cols., 2011*), mientras las mTECs expresan K5/K14, MTS10, ER-TR5 y UEA-1 (*Klug y cols., 1998; Gray y cols., 2002*). La K8 es típica de epitelios monoestratificados, siendo el primer filamento intermedio que se expresa durante la embriogénesis (*Baribault y cols., 1993*), y K5 se expresa en el compartimento proliferativo de epitelios estratificados regulándose negativamente al diferenciar (*Lifschitz-Mercer y cols., 1991*). En el epitelio tímico, las células K8+ son generalmente estrelladas y ocupan la corteza y zona subcapsular, con algunas células K8+K5- globulares en la médula, mientras las K5+ ocupan predominantemente la médula y el área córtico-medular con algunas células dispersas en la corteza y el área subcapsular (*Klug y cols., 1998*).

En el timo adulto, dentro de ambos compartimentos hay diferentes subpoblaciones epiteliales, cuyas relaciones entre sí son poco conocidas. En el caso de

la población cortical, recientemente se han definido distintas poblaciones de acuerdo a la expresión de CCR11 (Rode y Boehm, 2012), IL7 (Alves y cols., 2010) y Dll4 (Fiorini y cols., 2008). IL7 y Dll4 se expresan prácticamente en todas las células del primordio tímico, restringiéndose luego a un pequeño grupo de células cercanas al borde córtico-medular de fenotipo tanto cortical como medular (Hozumi y cols., 2008; Koch y cols., 2008; Alves y cols., 2009a). En el caso de la población medular, hay diferentes tipos celulares en función de la expresión de MHCII, CD80, AIRE y CCL21 (Lkhagvasuren y cols.; Nelson y cols., 1993; Gabler y cols., 2007; Rossi y cols., 2007a; Shakib y cols., 2009).

Durante la ontogenia, no está claro cómo se diferencian ambos compartimentos ni tampoco los diferentes tipos de células epiteliales dentro de cada uno de ellos, pero se han establecido algunos modelos de diferenciación en base a su aparición secuencial. Sabemos que existen precursores epiteliales en el timo embrionario (Gill y cols., 2002; Bleul y cols., 2006; Rossi y cols., 2006; Rodewald, 2008) y adulto (Bleul y cols., 2006) con capacidad de diferenciar a cTECs y mTECs maduras, por lo que se asume que tanto células corticales como medulares provienen de un **precursor bipotente común** (fig. 4).

El proceso de diferenciación del **epitelio cortical** es aún bastante desconocido. El primer marcador restringido a la corteza adulta que aparece en la ontogenia es DEC205, molécula involucrada en el procesamiento antigénico descrita por primera vez en DCs. A 12 dpc. aparecen por primera vez en la ontogenia TECs DEC205+ que expresan $\beta 5t$ y que, secuencialmente, diferencian tres subpoblaciones: DEC205+CD40-MHCII-, DEC205+CD40+MHCII+ proliferativas y DEC205+CD40+MHCII+ no proliferativas, que se supone representan la secuencia de diferenciación de las cTECs (Shakib y cols., 2009) (fig. 4A).

En el caso del **epitelio medular** se han definido también tres poblaciones: inmaduras MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE- (mTEC^{lo}); maduras, MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE^{hi} (mTEC^{hi}) y terminales MHCII^{lo}CD80^{lo}AIRE^{lo}Involucrina+ (Rossi y cols., 2007b; Nishikawa y cols., 2010; Wang y cols., 2012), cuya maduración se ha explicado en relación a la expresión del factor de transcripción AIRE, según dos modelos. En el modelo denominado de **diferenciación terminal** las células maduras MHCII^{hi}CD80/86^{hi}AIRE+ derivan de las

inmaduras MHCII^{lo}CD80/86^{lo}AIRE- (Gray y cols., 2007) (fig. 4B), de manera que a medida que se regula positivamente la expresión de estas moléculas lo hacen también los TSAs (Gabler y cols., 2007). Según el otro modelo, denominado de **restricción progresiva**, la expresión de AIRE y TSAs son características ya de las mTECs inmaduras y su diferenciación está controlada por AIRE (Gillard y Farr, 2005). Algunos resultados apoyan este modelo de restricción progresiva, como el hecho de que timos AIRE -/- tengan alterada la estructura medular y la composición de las subpoblaciones de mTECs y de TSAs (Ramsey y cols., 2002; Gillard y cols., 2007). Sin embargo, otros resultados que demuestran que los perfiles de expresión del gen de la caseína en mTECs están ligados a la diferenciación de tales células (Derbinski y cols., 2008), o el hecho de que ratones deficientes en AIRE tengan mTECs que expresan moléculas AIRE truncadas (Dooley y cols., 2008) que podrían ser eliminadas y, por tanto, sugerir una condición pre-apoptótica de AIRE (Gray y cols., 2007), apoyan un proceso de diferenciación final. Este modelo también se apoya en estudios en los que se genera una población AIRE+ a partir de células AIRE-, definidas por la expresión de Cld3/4 o la ausencia de CD80 (Hamazaki y cols., 2007; Rossi y cols., 2007a), por lo que parece haber consenso en que las TECs AIRE+ representan una población final de la secuencia de diferenciación de mTECs, aunque tampoco está resuelto cual sería el destino final de las células AIRE+. En un principio, mTECs MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE+ maduras se consideraron un estadio final postmitótico que terminaría sufriendo apoptosis (Gray y cols., 2007), pero otros datos apuntan a que aún podrían seguir diferenciando hasta un estadio final en que pasarían a formar parte de los corpúsculos de Hassall. Así, las células MHCII^{hi}CD80^{hi}AIRE+ diferenciarían a células MHCII^{lo}CD80^{int}AIRE-, que tienen un ciclo de vida de 2-3 semanas de las cuales AIRE solo se expresa durante 1-2 días, de manera que la pérdida del factor de transcripción conllevaría la caída de la expresión de CD80, MHCII y TSAs (Nishikawa y cols., 2010; Metzger y cols., 2013). En este estadio final las mTECs pasarían a formar parte de los corpúsculos de Hassall (Wang y cols., 2012), estructuras histológicamente similares a la epidermis que expresan marcadores epiteliales terminales, como involucrina (Hale y Markert, 2004) (fig. 4B). En apoyo de este modelo de diferenciación final de las mTECs AIRE+, Yano y colaboradores (Yano y cols., 2008) demostraron que los ratones AIRE -/- no tienen corpúsculos de Hassall y

que estos aparecen en la ontogenia después que las mTECs AIRE⁺ que, por otro lado, son las únicas células tímicas que expresan involucrina (White y cols., 2010).

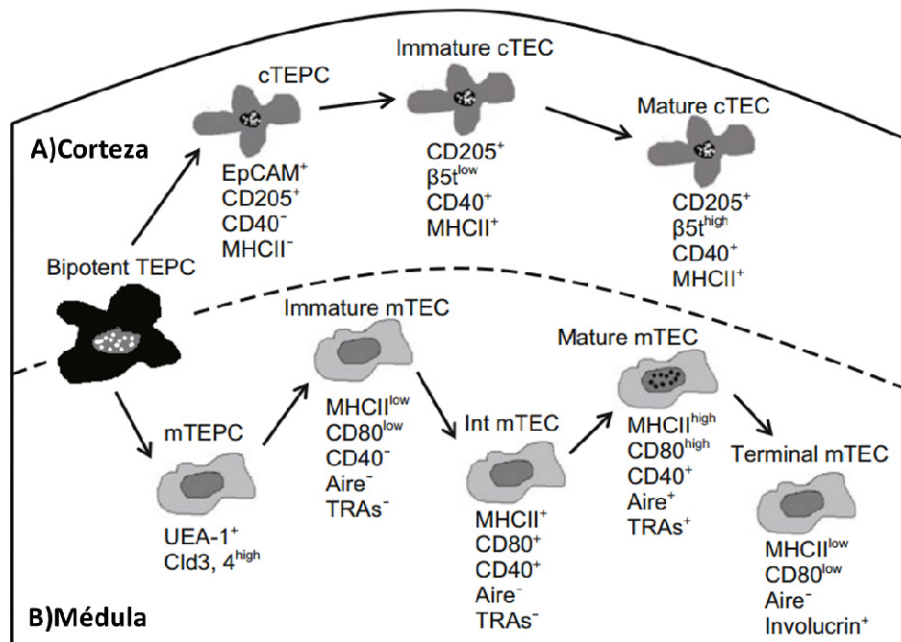


Figura 4. Diferenciación sincrónica de las TECs a partir de un progenitor bipotente común. Se muestran las diferentes etapas de maduración del epitelio cortical (A) y medular (B) murino, este último según el modelo de diferenciación terminal. TEPC: progenitor bipotente común. cTEPC: progenitores corticales. mTEPC: progenitores medulares. Adaptado de Sun y cols. (2013).

El modelo inicial de diferenciación corteza/médula asume, por tanto, una **diferenciación sincrónica** de ambos compartimentos a partir de un progenitor común que da lugar a precursores comprometidos de corteza y médula, respectivamente, que aún no expresan genes funcionales y que diferencian dando lugar a las células funcionales maduras (Gabler y cols., 2007; Hamazaki y cols., 2007; Shakib y cols., 2009). Sin embargo, estos progenitores intermedios restringidos a cada población no se han caracterizado. En el caso de la médula, los marcadores más tempranos asociados con el linaje medular son las claudinas 3 y 4 (Cld3/4). Las células Cld3/4⁺ de lóbulos tímicos de 13 dpc. dan lugar exclusivamente a células AIRE⁺ que ya estarían restringidas a ese linaje (Hamazaki y cols., 2007). Recientemente, se ha descrito dentro de las células Cld3/4⁺ una subpoblación que expresa SSEA-1 que contiene células clonogénicas, con capacidad de auto-renovación y de generar mTECs maduras *in vivo*. El número de estas células y, más importante, su capacidad clonogénica, desciende tras el nacimiento (Sekai y cols., 2014). Por otro lado, en el timo adulto la expresión de

Cld3/4 y de AIRE es, en gran medida, coincidente. También, se ha descrito la presencia de TECs CD205-CD40^{hi} en timos de 14,5 dpc., cuando empieza a aparecer un panel de genes específicos de mTECs (*Shakib y cols., 2009*), sugiriendo que podría representar un progenitor intermedio medular, pero desconocemos si corresponde a un estadio inmediatamente siguiente al de los progenitores bipotentes o no. También se ha descrito capacidad de regeneración de las células corticales adultas tras su eliminación específica, sugiriendo la existencia de un progenitor cortical inmaduro no caracterizado (*Rode y Boehm, 2012*). Finalmente, se ha descrito un compartimento intermedio entre los progenitores bipotentes y las cTECs maduras presente ya en el primordio tímico de 12,5 dpc. cuyas células expresan CD205 y $\beta 5t$, pero los resultados no son concluyentes (*Shakib y cols., 2009*).

Recientemente, otros resultados han cuestionado este modelo de diferenciación sincrónica y sugerido una diferenciación del compartimento medular subsiguiente a la del cortical. Como hemos señalado, el primordio epitelial tímico expresa desde muy pronto marcadores típicos de cTECs, como CD205, $\beta 5t$, IL7 y Dll4 (*Shakib y cols., 2009; Ripen y cols., 2011*) y numerosos datos indican que se pueden generar células medulares, y de hecho lo hacen “in vivo”, a partir de poblaciones que expresan dichos marcadores corticales. Así, RTOCs formados por células CD205+CD40- que expresan moléculas corticales, trasplantados *in vivo*, generan tanto cTECs $\beta 5t$ +CD205+ como mTECs AIRE+ (*Baik y cols., 2013*). Otro marcador temprano que se expresa en cTECs DEC205+Ly51+ es IL7 (*Ribeiro y cols., 2013*), aunque también lo hace en menor medida en mTECs (*Alves y cols., 2009a*). IL7 comienza a expresarse a 12,5 dpc., constituyendo a 13-14 dpc. la mayoría de las TECs, salvo una pequeña parte IL7- con características de mTEC, incluida la capacidad de responder a RANK (*Ribeiro y cols., 2013*). No obstante, en RTOCs, las TECs IL7+ son capaces de diferenciar tanto cTECs Ly51+CD205+ como mTECs CD80+. Desconocemos las relaciones entre estas dos poblaciones, pero estos resultados sugieren que las células IL7+ podrían ser una población intermedia capaz de comprometerse tanto con el linaje cortical o como con el medular, mientras las IL7- podrían ser una vía alternativa de diferenciación exclusivamente al linaje mTECs (*Ribeiro y cols., 2013*). *In vivo*, otros autores han demostrado expresión de $\beta 5t$ no solo en cTECs si no también en mTECs K5+Cld3/4+, incluidas las que expresan AIRE, a lo largo de la ontogenia y estudios *in vivo*

demuestran que las células medulares han expresado $\beta 5t$ en algún momento de su diferenciación (Ohigashi y cols., 2013). Todos estos datos sugieren diferenciación de mTECs a partir de cTECs. Sin embargo, la ausencia de $\beta 5t$ (Murata y cols., 2007; Nitta y cols., 2010), CD205 (Jenkinson y cols., 2012) ó IL7 (Alves y cols., 2014), no afecta el desarrollo de las mTECs AIRE+, por lo que la expresión de genes característicos de cTECs en células precursoras de mTECs sólo debe reflejar la existencia de estadios intermedios más que su directa implicación en la diferenciación de mTECs (Alves y cols., 2014). Sobre la base de estos resultados, se han planteado diferentes modelos de compromiso y diferenciación de las cTECs y mTECs a partir del progenitor bipotente común (fig. 5), considerando la existencia de progenitores intermedios que expresan marcadores corticales y mantienen capacidad bipotencial y que darían lugar a corteza y médula mediante un proceso de **progresión seriada**, que podría ser simétrica o asimétrica. Según el modelo de **progresión simétrica**, el progenitor bipotente generaría un progenitor intermedio común que expresaría marcadores corticales y, presumiblemente medulares (aunque esto no ha sido por el momento demostrado) y que diferenciaría a continuación simétricamente a los dos linajes. Alternativamente, se ha propuesto una **progresión asimétrica**, donde el progenitor bipotencial maduraría a un progenitor intermedio que expresaría marcadores corticales antes de comprometerse con el linaje medular, de manera que todas aquellas células que no lo hicieran engrosarían por defecto el compartimento cortical (fig. 5).

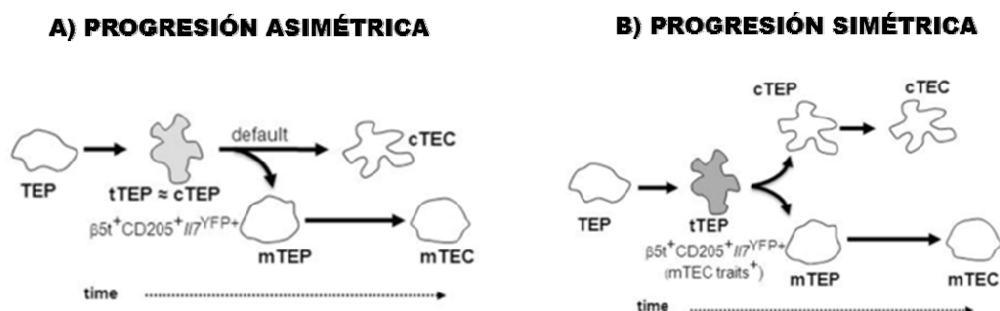


Figura 5. Diferenciación seriada de las TECs a partir de un progenitor bipotente. A) Diferenciación de mTECs y cTECs según un modelo de **progresión seriada asimétrica**. B) Diferenciación de mTECs y cTECs según un modelo de **progresión seriada simétrica**. TEP: progenitores bipotentes no comprometidos. tTEP: progenitor epitelial tímico intermedio. cTEP: progenitor epitelial cortical. mTEP: progenitor epitelial medular. Esquema adaptado de Alves y cols. (2014).

Resultados más recientes en los que se describe CCLR1 como un marcador terminal de cTECs que se adquiere progresivamente durante la ontogenia hasta alcanzar niveles altos de expresión en cTECs maduras (CCRL1^{hi}) y contribuye a la expansión del compartimento cortical (*Ohigashi y Takahama, 2014; Ribeiro y cols., 2014*), apoyan el modelo de progresión seriada. Además, identifican en estadios postnatales dos subpoblaciones de mTECs que expresan niveles intermedios de CCRL1 (CCRL1^{int}), CCRL1^{int}UEA+CD80- y CCRL1^{int}UEA+CD80+ y demuestran que RTOCs de células CCRL1+UEA-CD80- de 15 dpc. estimulados con RANKL y CD40L, dan lugar tras 7 días en cultivo a mTECs CD80+. Por tanto, las mTECs que expresan niveles intermedios de CCRL1 probablemente deriven de un progenitor común que expresa marcadores corticales, apoyando el modelo de diferenciación epitelial seriada asimétrica (*Alves y cols., 2014*).

3.2.3. Colonización y desarrollo linfoide.

Muy pronto en la ontogenia precursores linfoides provenientes del hígado fetal entran en el primordio tímico a través del mesénquima circundante (*Penit y Vasseur, 1989; Itoi y cols., 2001; Masuda y cols., 2005*) diferenciándose a medida que el órgano se forma. Esta colonización del timo por parte de los precursores linfoides, que sucede en ratón a 11 dpc., hace que el órgano se organice como una red esponjosa tridimensional (*van Ewijk y cols., 1999*) salvo en algunas estructuras císticas que mantienen una organización ápico-basal 2D (*Farr y cols., 2002; Dooley y cols., 2005a; Vroegindeweij y cols., 2010*), manteniendo, por tanto, sólo durante los primeros estadios del desarrollo la organización típica de la mayoría de los órganos epiteliales, donde las células se disponen sobre una membrana basal formando una lámina plana de células orientadas. Esta organización 3D de las TECs constituye una característica distintiva del microambiente tímico que se pierde, al menos parcialmente, en ausencia de precursores linfoides. Así, en el timo de ratones transgénicos para la cadena ϵ del CD3 humano, que muestran un bloqueo temprano en la diferenciación T, las cTECs se orientan en paralelo en vez de perpendiculares a la cápsula tímica y la estructura 3D de la médula es sustituida por grandes quistes que, a su vez, desaparecen si el órgano “tridimensionaliza” tras suministrarle células de médula ósea Rag^{-/-}. Igualmente,

estudios con ratones SCID, donde la corteza tímica permanece pero la médula no, reconstituyen su estructura 3D tras inyección de linfocitos T maduros CD4 y CD8 (*Shores y cols., 1991; van Ewijk y cols., 1994*).

A su vez, esta estructura tridimensional es necesaria para la diferenciación de las células T. Cultivos orgánicos, tanto FTOCs como RTOCs, establecidos con TECs, mantienen la estructura tridimensional y la diferenciación T, pero ni monocapas de TECs aisladas ni líneas celulares lo hacen (*Montecino-Rodriguez y cols., 1996*). Entre otras posibles causas, esto se debe a que la expresión de Dll1 y Dll4 desaparece en monocapas de TECs, recuperando la capacidad para diferenciar linfocitos al ser transfectadas con alguna de las dos moléculas, mientras que dicha expresión se mantiene en FTOCs y RTOCs (*Mohtashami y Zuniga-Pflucker, 2006*).

Al igual que se admite que un desarrollo normal de las TECs es necesario para el correcto desarrollo de los precursores linfoides y la generación de células T funcionalmente competentes (*Anderson y Jenkinson, 2001*), diversos trabajos apuntan que para una correcta maduración de las TECs también son necesarios los timocitos, ya que ratones con la diferenciación T bloqueada presentan defectos en el desarrollo de la corteza y/o la médula tímicas (*Shores y cols., 1991; van Ewijk y cols., 1994*). En ratones transgénicos para la cadena CD3 ϵ , que presentan un bloqueo del desarrollo linfoide en DN1, las cTECS de 15 dpc. no progresan más allá del estadio inmaduro CD205+CD40-MHCII⁻, mientras en ratones Rag1^{-/-}, con bloqueo en DN3, las células epiteliales alcanzan el estadio CD205+CD40+MHCII⁺, sugiriendo que mientras que la presencia de células DN1 no permite la maduración del epitelio tímico las células DN3 sí lo hacen (*Shakib y cols., 2009*). Más tarde aparecerán las regiones medulares cuando lo hagan los timocitos SP, correlacionando de nuevo la expansión medular con el aumento de células SP (*Gray y cols., 2006*). Aunque ratones con bloqueos tempranos en la diferenciación T, como aquellos deficientes en Zap70, tienen células AIRE⁺, es necesaria la presencia de timocitos SP para su expansión (*Irla y cols., 2008*). No obstante, en la generación de células AIRE⁺, intervienen otras células también de origen linfoide como LTis o células T V γ 5 (*Rossi y cols., 2007a; White y cols., 2008; Roberts y cols., 2012*).

Todos estos datos demuestran que la interacción linfoepitelial es necesaria para la maduración final del epitelio tímico, aunque la diferenciación temprana o el compromiso con uno de los dos linajes es independiente de timocitos, dado que timos de ratones alinfoides *Ikaros* $-/-$ y dobles KO *Rag* $-/-$ γc $-/-$, con un bloqueo muy temprano en la diferenciación T, presentan en los primeros estadios del desarrollo diferenciación del linaje cortical y medular en base a la expresión diferencial de K5 y K8 (*Klug y cols., 2002*).

3.2.4. Regulación del desarrollo tímico.

3.2.4.1 FoxN1.

Como ya se ha comentado, el factor conocido más determinante para la diferenciación del epitelio tímico es FoxN1, ya que en su ausencia el epitelio endodérmico diferencia como un rudimento no funcional (*Cordier y Heremans, 1975*) pero no están claras las vías moleculares o targets específicos de FoxN1 que podrían regular su implicación. FoxN1 regula directa o indirectamente la expresión de genes de función tímica, que exhiben respuestas distintas a dosis diferentes de la molécula (*Nowell y cols., 2011*). Así, parece regular la expresión de CXCL12 y CCL25 (*Bleul y Boehm, 2000; Koch y cols., 2008; Bajoghli y cols., 2009*), implicados en la migración de progenitores al primordio tímico; de Dll4 y Dll1, ligandos de Notch implicados en la determinación del compromiso T en dichos progenitores (*Tsukamoto y cols., 2005*), de $\beta 5t$, proteína específica del proteosoma de cTECs (*Ripen y cols., 2011*) y de otras moléculas importantes para la función inmunológica del epitelio tímico, como catepsina L, CD40 y moléculas de clase II del MHC (*Nowell y cols., 2011*). FoxN1 parece también participar en la invasión de las células endoteliales y del mesénquima perivascular, que formarán las trabéculas y los vasos del parénquima tímico temprano tanto en humanos (*Farley y cols., 2013*), como en ratón (*Mori y cols., 2010*).

Además de la importancia de esta molécula para la determinación del primordio tímico, FoxN1 parece jugar un papel también importante en la diferenciación posterior y en el mantenimiento de las poblaciones epiteliales maduras, aunque su papel exacto no está claro. Por un lado, se dice que FoxN1 se expresa

diferencialmente durante la especificación del linaje del epitelio tímico expresándose en todas las TECs durante la vida prenatal pero no en todas las postnatales. También se ha descrito una expresión diferencial de FoxN1 en cTECs y mTECs, de forma que la pérdida de FoxN1 afectaría la maduración de las mTECs pero no la de las cTECs (Cheng y cols., 2010). Otros datos, sin embargo, apuntan que FoxN1 juega un papel central en la homeostasis del timo adulto (Corbeaux y cols., 2010). Blackburn y colaboradores (Blackburn y cols., 1996) demostraron que FoxN1 es necesario para el desarrollo postnatal de todos los linajes de TECs, pero datos más recientes de este mismo grupo (Nowell y cols., 2011), analizando el timo de ratones con un alelo hipomórfico FoxN1 que expresaban de manera modulable distintos niveles de la molécula, indican que el factor de transcripción no parece participar en la determinación del compromiso del progenitor epitelial común en el linaje medular, ya que los ratones *Nude* expresan en sus primeras etapas de desarrollo algunos marcadores de epitelio medular como Cld3/4 o K5, pero sí en la progresión de la diferenciación de los distintos subsets de ambos linajes, tanto en timo fetal como postnatal, necesitándose distintos niveles de expresión de FoxN1 para regular distintos estadios de la diferenciación epitelial. Bajos niveles de FoxN1 serían suficientes para iniciar el programa de diferenciación epitelial pero hacen falta más altos para alcanzar la plena maduración funcional de las TECs y para mantener posteriormente la identidad del linaje (Chen y cols., 2009; Nowell y cols., 2011).

Por otra parte, el envejecimiento tímico cursa con un descenso en la expresión de FoxN1 (Ortman y cols., 2002; Sun y cols., 2010), su delección en el timo postnatal induce involución (Chen y cols., 2009; Cheng y cols., 2010), su sobreexpresión la retrasa pero no la impide (Zook y cols., 2011) y la inyección intratímica de cDNA de FoxN1 produce en ratones viejos un aumento tanto del tamaño del timo como del número de timocitos (Sun y cols., 2010). Bredenkamp y colaboradores (Bredenkamp y cols., 2014a) han demostrado que la sobreexpresión de FoxN1 es suficiente para regenerar un timo viejo, dando lugar a un timo juvenil en términos de arquitectura, expresión génica y funcionalidad. Por tanto, también en el timo adulto FoxN1 actuaría, de forma dosis dependiente, en el mantenimiento de las poblaciones epiteliales (Chen y cols., 2009).

Por otro lado, la familia de proteínas del retinoblastoma (RB, p107, p130) regula la transcripción de FoxN1, aumentando su expresión. RB fosforila y activa E2F, un factor de transcripción implicado en la transición G1/S, de manera que el complejo RB-E2F-FoxN1 es crítico para la involución y función tímica (*Garfin y cols., 2013*). Por tanto, FoxN1 no sólo participa en la diferenciación del epitelio tímico sino que también promueve su proliferación celular regulando genes de fase S y, junto con IL-22, interviene en la regeneración tímica, ya que la eliminación selectiva de células T DP por tratamiento con dexametasona aumenta los niveles intratímicos de FoxN1 e IL-22, desencadenando el programa de regeneración de las TECs (*Pan y cols., 2014*).

La cuestión actualmente en debate es si FoxN1 es suficiente y directamente responsable de disparar el programa genético de diferenciación epitelial tímica tanto en el caso fetal como en el adulto como indican muchos de los resultados anteriormente indicados. Algunos datos apuntan a que pudiera ser así. La reversión del genotipo *Nude* en células tímicas aisladas de timos *Nude* postnatales, resulta en la formación de pequeños timoides que diferencian corteza y médula y permiten la diferenciación T (*Bleul y cols., 2006*). Muy recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de FoxN1 en fibroblastos primarios permite generar “in vitro” un timo funcional, organizado y capaz de diferenciación T (*Bredenkamp y cols., 2014b*). Sin embargo, no se puede descartar la implicación de otras rutas alternativas independientes de FoxN1 en la maduración funcional del epitelio tímico. Durante el desarrollo se ha detectado actividad y expresión fetal de IL7 en ratones FoxN1 $-/-$ (*Zamisch y cols., 2005*). En estadíos postnatales hay TECs FoxN1 $-/-$ que expresan CCL25 y Dll4 (*Itoi y cols., 2007*). Recientemente, Ucar y colaboradores (*Ucar y cols., 2014*) han demostrado la presencia de progenitores bipotenciales con características de células stem en timos adultos FoxN1 $-/-$ (TSFCs), que forman timoesferas constituidas por células que expresan diferencialmente K8 o K14, por lo que concluyen que FoxN1 es prescindible tanto para el mantenimiento de la población stem como para su compromiso a cTECs o mTECs siendo, sin embargo, necesario para la posterior diferenciación y supervivencia de las TECs. En este mismo sentido, Liu y colaboradores han determinado que la administración de células mesenquimales derivadas del cordón umbilical (UC-MSCs) es capaz por sí sola de restaurar la arquitectura tímica de ratones FoxN1 $-/-$, promoviendo la diferenciación de las TECs, la timopoyesis y la

migración de las células T maduras a la periferia, vía varias citocinas producidas por las UC-MSCs, fundamentalmente FGF7 (*Liu y cols., 2014*).

Tampoco están del todo claras las relaciones de FoxN1 con otros factores implicados en el desarrollo pre y postnatal del timo. Se ha sugerido que p63 actuaría en el desarrollo fetal promoviendo la proliferación de los progenitores comunes tras su especificación a timo por FoxN1 y antes de su compromiso a cTEC o mTEC (*Senoo y cols., 2007*). En el timo adulto se ha señalado que FoxN1 colabora con el factor de transcripción Trp63, un homólogo del supresor tumoral p63, implicado en el desarrollo de los epitelios estratificados de distintos órganos (*Candi y cols., 2007*). Los dos factores podrían sinergizar para regular la homeóstasis de las TECs (*Romano y cols., 2013*). Primero el pool de progenitores epiteliales tímicos sufriría expansión vía proliferación y auto-renovación mediada, principalmente, por la isoforma ΔN p63 y, luego, los progenitores diferenciarían a cTECs y mTECs bajo el control de FoxN1 (*Burnley y cols., 2013*).

El papel jugado por FoxN1 en la tridimensionalización epitelial y en la aparición de quistes, cuando dicha estructura 3D se pierde, ha sido también investigado. Por un lado, la generación de quistes 2D en FTOCs tratados con desoxiguanosina fue considerada independiente de FoxN1 (*Vroegindeweij y cols., 2010*), pero otros datos han demostrado que la tridimensionalización es dependiente del factor de transcripción, y la aparición de quistes parece producirse en ausencia de interacciones T-TECs lo que colapsa la red epitelial e impide su tridimensionalización (*Soza-Ried y cols., 2008*). En este sentido, Guo y colaboradores demostraron que la expresión de FoxN1 en mTECs K14+ era esencial para la morfogénesis y el mantenimiento de la arquitectura medular y, por el contrario, su delección condicionada en tales células inhibía el desarrollo de las TECs, acumulaba quistes y generaba la desaparición de la estructura 3D del epitelio tímico (*Guo y cols., 2011*).

3.2.4.2. Regulación de la determinación del linaje cortical-medular.

Como ya se ha comentado, actualmente se contempla un modelo de diferenciación simétrica progresiva, donde los precursores comunes, tras la acción de

FoxN1, dan lugar simultáneamente a progenitores comprometidos con los compartimentos cortical y medular que aumentan en número con el concurso de p63 (*Senoo y cols., 2007; Burnley y cols., 2013*). Posteriormente, los precursores comprometidos diferencian como linajes independientes. Según este modelo, ambas vías no serían alternativas y, por tanto, no existiría una señal o ruta de determinación de linaje sino que la diferenciación y amplificación de ambos compartimentos estaría regulada de forma independiente vía sus propios precursores (*Sun y cols., 2013*). Sin embargo, como ya se ha comentado, se empieza a considerar un modelo asimétrico que requeriría de señales que determinen que un progenitor común diferencie hacia un linaje excluyendo el otro (*Alves y cols., 2014*). Nada se sabe, sin embargo, de qué señales o rutas podrían afectar esta decisión. Esta hipótesis implica que la diferenciación por defecto sería la cortical y algunas células recibirían señales para abandonar esta vía e iniciar una diferenciación medular. Resultados previos de nuestro grupo (*Muñoz y cols., 2014*) también cuestionaban un modelo simétrico de determinación corteza/médula durante la ontogenia tímica y apuntaban a un modelo asimétrico donde la diferenciación corteza/médula se basa en el propio desarrollo histológico del órgano y está predeterminada por un patrón de crecimiento de morfogénesis ramificada y formación de lumen y sería posterior o concomitante a éstos (*Muñoz y cols., 2014*) (ver después). Además, este modelo implica que la homeostasis del timo adulto debe contemplar vías de diferenciación y mantenimiento de las poblaciones epiteliales distintas, lo que implicaría que la diferenciación fetal y adulta del epitelio tímico no serían comparables.

3.2.4.3. Regulación de la diferenciación cortical.

Los mecanismos y los determinantes de la interacción entre los timocitos y las células epiteliales aún están por definir concluyentemente. En el caso del epitelio cortical, aparte de las interacciones péptido-MHC-TCR implicadas en selección positiva, parecen implicados IL7 y Dll4, que inducen proliferación y diferenciación de timocitos DN, y ciertas quimiocinas que permiten (con el concurso de moléculas de la matriz extracelular y sus receptores celulares) la correcta localización de timocitos DN y DP en

los adecuados nichos corticales, pero desconocemos la naturaleza de las cTECs implicadas y de las moléculas necesarias para la maduración del epitelio cortical.

3.2.4.4. Regulación de la diferenciación medular.

En la maduración del epitelio medular, se ha demostrado la implicación particularmente de miembros de la superfamilia de receptores del TNF, como RANK, CD40, LT β R que se expresan en mTECs, y sus correspondientes vías de señalización. En general, la señalización **RANK-RANKL** inicia la formación y maduración de mTECs, que se bloquea si hay alteraciones en la misma, cursando con fallos en la tolerancia central. En el timo embrionario, la señal de RANK es activada a través de RANKL, expresado en células inductoras linfoides (LTis) y células T $\gamma\delta$ canónicas V γ 5+, que promueven la maduración de células CD80-AIRE- a células CD80+AIRE+ (Rossi y cols., 2007a; Roberts y cols., 2012). En el timo adulto la activación está mediada por timocitos SP CD4+ seleccionados positivamente. La ruptura postnatal de la señalización RANK-RANKL cursa con reducción de células UEA+CD80^{hi}MHCII^{hi} maduras y autoinmunidad (Akiyama y cols., 2008; Hikosaka y cols., 2008), y el trasplante de timos o esplenocitos RANKL -/- en ratones deficientes produce inflamación y autoanticuerpos (Rossi y cols., 2007a; Akiyama y cols., 2008). Por el contrario, la sobreexpresión de RANKL en los timocitos produce expansión del compartimento medular, que afecta a todas las poblaciones de mTECs, aumento de mTECs maduras que expresan AIRE, UEA1 y MHCII en estadios postnatales, y reducción casi total del compartimento cortical (Danzl y cols., 2014). El par **CD40/CD40L** también es importante para la maduración de las mTECs, pero su ausencia genera un fenotipo menos severo que la falta de RANK/RANKL. Ambas vías de señalización deben cooperar en la maduración del epitelio medular, puesto que los efectos son mayores en el doble mutante (Akiyama y cols., 2008; Hikosaka y cols., 2008; Irla y cols., 2008).

Hay dos ligandos de **LT β R** en timocitos SP, LT α 1 β 2 y LIGHT (Irla y cols., 2010). La ausencia del receptor, de cualquiera de los ligandos o de cualquier molécula expresada en la vía de señalización después de NIK (NF- κ B inducing kinase), produce desorganización histológica de la médula, reducción del número de mTECs totales, bloqueo de la maduración T y autoinmunidad (Boehm y cols., 2003; Venanzi y cols.,

2007). Curiosamente, el fenotipo del KO para el receptor es más severo que el de los ligandos, lo que sugiere que otros ligandos no identificados podrían estar implicados (Boehm y cols., 2003). Por otro lado, algunos autores (Chin y cols., 2003), pero no otros (Martins y cols., 2008), apuntan que la señalización vía $LT\beta R$ es necesaria para la expresión de TSAs AIRE-dependientes, pero además, se ha apuntado que dicha señalización está implicada en la expresión de TSAs AIRE-independientes (Chin y cols., 2006; Seach y cols., 2008), sugiriendo que esta señalización y AIRE no guardan relación (Venzani y cols., 2007), aunque los modelos experimentales utilizados en estos estudios son difíciles de comparar. Por otro lado, ratones deficientes en $LT\alpha$ ó $LT\beta$ tienen expresiones normales de CD80, CD40, AIRE y TSAs, pero el área medular está reducida y su estructura tridimensional alterada, organizada en su mayor parte como “islas” medulares aisladas (Martins y cols., 2008; Seach y cols., 2008; Irla y cols., 2013).

Todos estos datos apuntan que dos moléculas de la familia TNFR podrían cooperar en la regulación del desarrollo de las mTECs. Los dobles KO para $LT\beta R$ y RANKL son más severos que los simples; la señalización $LT\beta R$ podría up-regular la expresión de RANK en el estroma tímico, cuya activación provocaría la diferenciación de las mTECs (Mouri y cols., 2011). Finalmente, aunque el desarrollo inicial de las mTECs AIRE- requiere de RANK, su maduración terminal a mTECs involucrina + parece requerir señalización $LT\alpha$ - $LT\beta R$ proporcionada por timocitos maduros (White y cols., 2010), lo que también apunta a la cooperación entre ambas vías de señalización.

Distintos estudios sobre las moléculas de la vía de señalización canónica y no canónica de los TNFR, confirman el papel de esta familia en la maduración de epitelio medular tímico. Los ratones TRAF6^{-/-} (TNFR associated factor 6), un elemento de la **vía canónica de NF- κ B** iniciada por RANK y CD40, muestran una severa destrucción de la estructura medular con pérdida de mTECs UEA+ y ausencia de AIRE (Akiyama y cols., 2005; Danzl y cols., 2014). Además, ratones deficientes en moléculas de la **vía no canónica de NF- κ B** (NIK, IKK α y RelB) tienen alteraciones del desarrollo tímico con reducción de mTECs UEA+ y/o AIRE+ (Burkly y cols., 1995; Weih y cols., 1995; Kajiura y cols., 2004; Kinoshita y cols., 2006; Lomada y cols., 2007). También ratones NF- κ B^{-/-} muestran menor número de mTECs CD80^{hi} y baja expresión de AIRE con el consiguiente desarrollo de autoinmunidad (Zhang y cols., 2006; Zhu y cols., 2006).

4. Mecanismos de organogénesis/histogénesis y su relación con la diferenciación de las células epiteliales tímicas.

Aunque en los últimos tiempos se ha hecho un gran esfuerzo para determinar la secuencia de diferenciación del epitelio tímico y se han acumulado numerosos datos a este respecto, la mayoría de los mismos, como ya se ha indicado, proceden de un abordaje celular intentando identificar las etapas de diferenciación de los distintos linajes epiteliales a partir de precursores comunes. Existen, por el contrario, pocos trabajos que hayan estudiado este proceso desde una perspectiva morfogénica. Una primera evidencia en este sentido proviene de los experimentos con ratones quiméricos para MHC, en los que Rodewald y colaboradores observaron que las primeras células que expresan marcadores medulares aparecen como grupos independientes o islas, surgidas cada una de ellas, a partir de una única célula inicial, ya que la mayoría de los islotes expresaba un único tipo de los MHC presentes en la quimera (Rodewald y cols., 2001). Los autores propusieron que, posteriormente, estas islas se fusionarían dando lugar a una médula confluyente y continua como las observadas en timo adulto (Anderson y cols., 2000; Rodewald y cols., 2001). Sin embargo, la identificación de nuevos precursores comunes y el modelo simétrico de diferenciación han condicionado la interpretación de estos resultados impulsando la idea, hoy admitida, de que cada una de estas islas medulares reflejan la diferenciación corteza/médula de un único precursor común inicial presente en el esbozo tímico de 12 dpc. Así, se ha descrito que el primordio tímico inicial pierde el lumen primitivo y se remodela en una masa epitelial más o menos homogénea, donde cada precursor común organizaría una unidad de precursores corticales y medulares. De acuerdo a esta interpretación, los experimentos en que una o unas pocas células de 12 dpc. se inyectaban en lóbulos tímicos fetales, demostraban la existencia de un precursor común corteza/médula (Rossi y cols., 2006) y también implicarían que cualquier célula tomada al azar de un timo de 12 dpc. inyectada en cualquier zona del primordio, daría lugar a corteza y a médula, ya que en ningún caso se encontraron sólo células corticales o medulares derivadas de la célula inyectada. Por tanto, según estos resultados, en condiciones fisiológicas todas y cada una de las células del primordio

darían de facto lugar a cTECs y mTECs, o bien quedarían como reservorio de precursores comunes, puesto que una parte de éstos parecen mantenerse postnatalmente (*Bleul y cols., 2006*). Por otra parte, se ha descrito que RTOCs en los que se mezclan células *Nude* y *wt* en proporciones variables dan lugar a timos con un número de células epiteliales proporcional a la cantidad inicial de precursores *wt*, por lo que los autores concluyen que la capacidad de proliferación y diferenciación de los precursores comunes iniciales del timo sería limitada (*Jenkinson y cols., 2008*). De esta manera, se ha calculado que el número de islotes medulares que generarían finalmente la médula adulta podría corresponder al número inicial de precursores presentes en el primordio tímico (*Rodewald, 2008*).

Esta idea de una organización medular a partir de islotes medulares incipientes y la concepción del modelo simétrico de diferenciación epitelial también ha condicionado la interpretación de otros resultados. Hamazaki y colaboradores (*Hamazaki y cols., 2007*) indicaron que las células epiteliales medulares AIRE⁺ son Cld3/4⁺ y se generan a partir de células Cld3/4⁺AIRE⁻ y éstas a su vez a partir de células Cld3/4⁻. Describen en el primordio tímico de 13,5 dpc. estas células Cld3/4⁺, que coexpresan MTS10, como células o grupos celulares aislados, en los que se expresa por primera vez UEA. Aunque estos mismos autores observaron expresión de Cld3/4 en la capa luminal del esbozo tímico en estadios anteriores (10,5 dpc.) cuando éste está aún polarizado y presenta un lumen central, interpretan que este esbozo se reorganiza y las células regulan negativamente la expresión de Cld3/4. Una vez reorganizado el esbozo tímico, células Cld3/4⁻, con capacidad para generar TECs corticales y medulares, darán lugar a células Cld3/4⁺ ya comprometidas con el linaje medular (*Hamazaki y cols., 2007; Hollander, 2007*). Recientemente se ha descrito que las células Cld3/4⁺ embrionarias son capaces de regenerar la médula en ratones *aly/aly*, incapaces de diferenciación del epitelio medular. Dentro de la población Cld3/4⁺ hay una subpoblación que expresa SSEA-1, con capacidad clonogénica, que mantiene la capacidad de regenerar la médula y podría constituir la población de células madre medulares que en bajo número permanecen en estadios adultos (*Sekai y cols., 2014*).

A 13,5 dpc., el compromiso corteza/médula ya ha tenido lugar y el timo ha sido colonizado por los precursores linfoides (fig. 6). A partir de 13,5 dpc. el timo crece y los esbozos de corteza y médula maduran definitivamente, adquiriendo el epitelio tímico su típica organización tridimensional (Manley, 2000). Como hemos indicado en apartados anteriores, numerosos datos demuestran la necesidad tanto de mesénquima como de los linfocitos en desarrollo en estos procesos, siendo el mesénquima necesario fundamentalmente para la correcta formación y posicionamiento del esbozo tímico (Bockman y Kirby, 1984; Suniara y cols., 2000) y los timocitos para la expansión y posterior maduración de los compartimentos. Sin embargo, ninguno de ellos parece necesario para la diferenciación inicial corteza/médula (Klug y cols., 2002; Jenkinson y cols., 2005), reforzando la hipótesis de la existencia de un precursor epitelial común con capacidad aparentemente autónoma para diferenciar fenotípicamente los precursores epiteliales medulares y corticales.

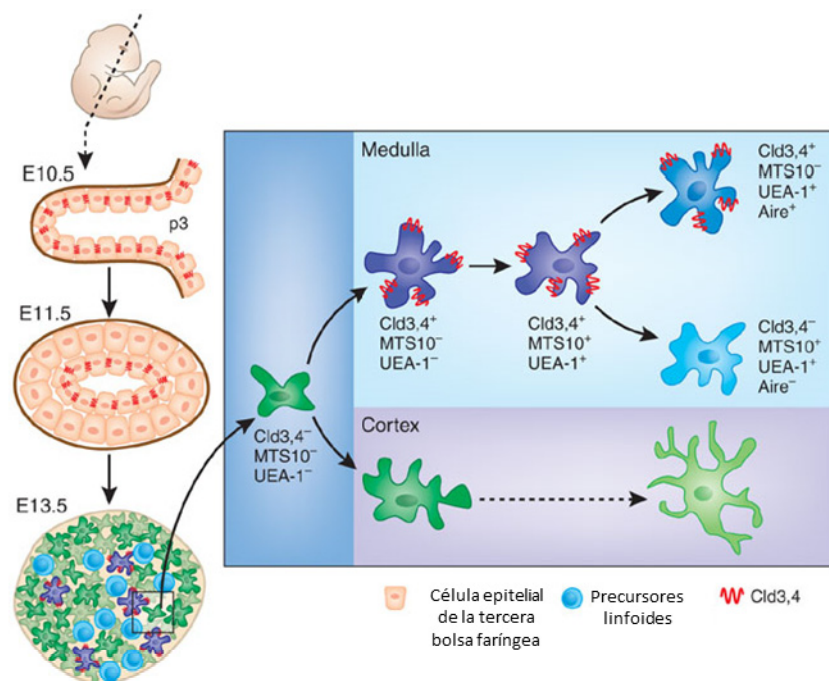


Figura 6. Diferenciación epitelial tímica en base a la expresión de Cld3/4. La expresión de Cld3/4 en el endodermo se mantiene en la capa apical del esbozo tímico a 11,5 dpc. A 13,5 dpc. tras la colonización linfoide, el epitelio se reorganiza y pierde su polaridad, quedando algunas células Cld3/4+ aisladas ya comprometidas a médula, que surgen de células Cld3/4- con capacidad para generar tanto cTECs como mTECs. Las células Cld3/4+ adquieren primero la expresión de MTS10 y UEA y generan tanto células AIRE+MTS10- como AIRE-MTS10+. Adaptado de Hollander (2007).

Frente a este modelo, nuestro grupo (*Muñoz y cols., 2014*) ha propuesto otro alternativo, en el que los procesos de proliferación y diferenciación celular están íntimamente relacionados con la localización y continuidad de las áreas epiteliales corticales y medulares en el esbozo tímico temprano. A los 10,5 dpc., tras la evaginación del endodermo de la tercera bolsa faríngea, el primordio tímico es un rudimento epitelial biestratificado que expresa en la capa apical Cld3/4 y proteínas ZO (zonula occludens), que forman parte de las uniones estrechas y cuya función es mantener la polaridad celular y actuar como barrera de separación entre distintos dominios dentro de los tejidos epiteliales, lo que confirma la polarización del epitelio tímico en torno al lumen central (*Hamazaki y cols., 2007*). A los 11,5 dpc. el primordio tímico expresa homogéneamente las glicoproteínas MTS20 y MTS24, y K8, observándose ya al final de este estadio cierta heterogeneidad dentro del mismo con respecto a la expresión de estos marcadores y de K5, que se expresa más fuertemente en la parte central del órgano (*Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002; Klug y cols., 2002*). También a esta edad se ha descrito que la capa de células que forman el lumen de la cavidad faríngea mantiene en su zona más apical la expresión de Cld3/4, (*Hamazaki y cols., 2007*). Nuestros resultados muestran que a esa edad el timo se organiza como una estructura bi-pluriestratificada (con pocas capas celulares) en la que aún se distingue un lumen central limitado por células K5+Cld3/4+ que muestra una incipiente ramificación. A partir de entonces, durante las primeras etapas del desarrollo del timo, su crecimiento se acompaña de la formación de lobulillos y se puede distinguir un lumen central bordeado por células Cld3/4+K5+ desde 11,5 dpc. incluso hasta 13,5 dpc. Además de limitar este lumen, las células Cld3/4+K5+ forman una estructura ramificada continua que aumenta su longitud y grado de ramificación entre los 11,5 dpc. y los 13,5 dpc. A 11,5 dpc. estas células bordean el lumen primario inicial del esbozo tímico y a 12,5 dpc. continúan limitando el mismo lumen aun visible y, en las nuevas ramificaciones Cld3/4+K5+, define nuevos lúmenes y microlúmenes secundarios. A los 13,5 dpc. el grado de ramificación aumenta y las células Cld3/4+K5+ se alinean formando cordones que definen microlúmenes y alineamientos de superficies celulares en los que se produce polarización de moléculas apicales, denominados canales o trazados de polarización (fig. 7) (*Muñoz y cols., 2014*).

Así pues, en estas etapas iniciales del desarrollo del timo, la organización histológica se asemeja a la estructura típica de otros órganos epiteliales que se desarrollan según un patrón de morfogénesis ramificada, en los que se produce formación y elongación de lumen dentro de una masa epitelial tridimensional o yema constituida por células empaquetadas no polarizadas (*Jaskoll y cols., 2002; Tucker, 2007; Walker y cols., 2008*) que no presenta inicialmente un lumen. En los órganos que siguen este patrón de desarrollo, la formación del lumen se produce, por lo general, secuencialmente desde la región proximal hacia los extremos distales (*Patel y cols., 2011*). En el caso del timo, la tinción continua de Cld3/4 que define el lumen central original y las ramificaciones surgidas de él, en las que se definen lúmenes secundarios, microlúmenes y alineamientos de superficies celulares, recuerda especialmente la formación de lumen en el primordio del páncreas. En este órgano no hay una estructura ductal inicial ni yemas terminales, sino que se produce la remodelación de una masa epitelial en crecimiento en relación con un plexo epitelial formado por la polarización de las células en las regiones centrales de la masa que se va reorganizando para formar finalmente un sistema ductal completo (*Hick y cols., 2009; Villaseñor y cols., 2010*). Como muestran nuestros resultados, durante el desarrollo del páncreas, un lumen central inicial está presente en la masa epitelial de 12 dpc. La masa epitelial se remodela formándose grupos (rosetas) de células polarizadas, que organizan lúmenes ciegos secundarios o microlúmenes independientes que conectan progresivamente entre sí y con el lumen primario central por alineamiento de las células polarizadas, dando lugar a la formación de los denominados canales de polarización o trazados de células polarizadas (*Hick y cols., 2009; Villaseñor y cols., 2010*).

Como ya se ha comentado, las células Cld3/4+ podrían constituir los precursores fetales comprometidos con el linaje medular (*Hamazaki y cols., 2007; Sekai y cols., 2014*). En consonancia con estos resultados, nuestros resultados previos mostraban que entre 12,5 dpc. y 13,5 dpc. la expresión de MTS10 se regula positivamente en las células Cld3/4+ continua y progresivamente en una secuencia tronco-rama (fig. 8). Estos resultados implican que la médula tímica se diferencia como una estructura continua y ramificada desde etapas muy tempranas a partir de células

del lumen o de células que siguen un proceso de formación de lumen de novo. El aumento de la longitud y el grado de ramificación de la estructura luminal/preluminal Cld3/4+, junto con el hecho de que la expresión MTS10 se regula positivamente en una secuencia tronco-rama, también sugiere que la formación de lumen y el compromiso a médula debe producirse en los extremos distales, mientras que la zona del lumen o con diferenciación luminal/proximal anteriormente formada, ya se está diferenciando a médula. De acuerdo con esto, los resultados de Hamazaki y colaboradores demostraron que, mientras que las células Cld3/4+ de lóbulos fetales de 13,5 dpc. dan lugar exclusivamente a células medulares, las células Cld3/4- dan lugar a linajes tanto corticales como medulares (*Hamazaki y cols., 2007*), lo que indicaría que este último grupo de células contiene tanto células comprometidas con linaje cortical (*Shakib y cols., 2009*), como no comprometidas o con capacidad para generar linaje medular según un modelo asimétrico. Esto encaja bien con la idea de una masa epitelial en la que tiene lugar formación de lumen de novo de manera distal y a continuación compromiso medular de las células formadoras de lumen en una dirección proximal-distal. Nuestros resultados también parecen indicar que las ramificaciones del lumen siguen un patrón definido como se espera en órganos con desarrollo según un patrón de morfogénesis ramificada. En consonancia con este modelo, la médula del timo de rata adulta ha sido descrita como una estructura ramificada de orden 4-5 en la que la relación de los tamaños de las ramas es matemáticamente constante (*Ginda y cols., 1994*).

Sobre la base de estos resultados, propusimos recientemente que la organogénesis del timo, que finalmente da lugar a un órgano adulto multilobulado con una médula en forma dendrítica continua rodeada de la corteza, se basa en, o contiene, elementos de un patrón de desarrollo de morfogénesis ramificada (figs. 7 y 8). Según este modelo las células en el centro de una masa epitelial polarizan y se alinean formando cordones epiteliales, adquieren polaridad apical-basal, y comienzan a establecer complejos de unión para formar una serie de lúmenes y microlúmenes, inicialmente discontinuos, que eventualmente se unirían para convertirse en un lumen continuo, siendo estas células Cld3/4+ formadoras de lumen de novo las que desarrollarán la médula del timo (*Muñoz y cols., 2014*).

Sin embargo, en el caso del timo este proceso de formación de lumen es difícil de evidenciar porque desde los 11,5 dpc. contiene precursores linfoides. Éstos se incorporan entre las células epiteliales, esencialmente entre aquellas de la masa intermedia no polarizada, haciéndolas formar una red tridimensional, lo que limita sus semejanzas con cualquier otro órgano generado por morfogénesis ramificada, ya que modifica las polaridades celulares y dificulta la identificación de la estructura histológica epitelial. Además, a partir de 14 dpc., ni las células medulares se desarrollan finalmente como un lumen definitivo ni la yema/masa epitelial que las rodea se reorganiza en una estructura tubular con yemas terminales finales, acinos u otro tipo de estructuras distales diferenciadas, sino que permanece con una organización concéntrica en la que la zona central medular no presenta un lumen aparente y está rodeada por una corteza tímica diferenciada (fig. 7) (*Muñoz y cols., 2014*). Este modelo implicaría que, de alguna manera, el programa de diferenciación específico del timo se superpondría a este patrón básico de morfogénesis ramificada, modificado como consecuencia, presumiblemente, de la expresión de FoxN1 y la llegada de los primeros precursores linfoides.

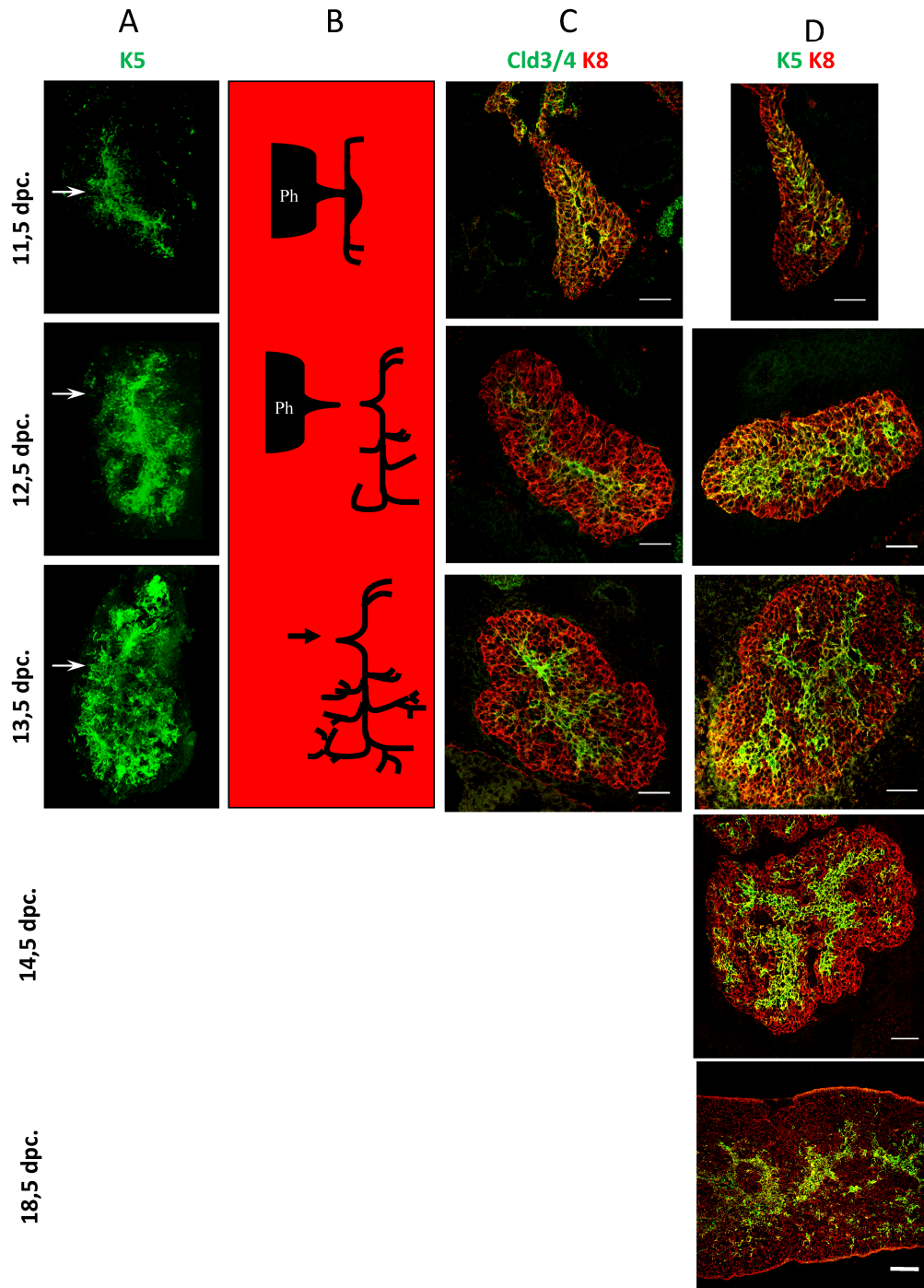


Figura 7. Desarrollo del timo según un proceso de formación de lumen y ramificación. **A.** Proyecciones de máxima intensidad de lóbulos tímicos de 11,5 dpc., 12,5 dpc. y 13,5 dpc. procesados para inmunodetección “in toto” de K5. Las flechas indican la conexión del lumen con la bolsa faríngea. **B.** Esquemas representativos del grado de ramificación en lóbulos tímicos de 11,5 dpc., 12,5 dpc. y 13,5 dpc. **C.** Secciones representativas de lóbulos tímicos de 11,5 dpc., 12,5 dpc. y 13,5 dpc. procesados para inmunodetección de Cld3/4 (verde) y K8 (rojo). **D.** Secciones representativas de lóbulos tímicos de 11,5 dpc., 12,5 dpc., 13,5 dpc., 14,5 dpc. y 18,5 dpc. procesados para inmunodetección de K5 (verde) y K8 (rojo). Se observa hasta 13,5 dpc. el lumen inicial delimitado por células Cld3/4+K5+, definiendo, además, estas células una estructura ramificada que aumenta su longitud y grado de ramificación a medida que avanza el desarrollo. A partir de 14,5 dpc. se mantiene la estructura ramificada pero ya no se observa un lumen aparente. Barras de escala 18,5 dpc.: 240 μ m; 14,5 dpc.: 120 μ m; Resto: 50 μ m. Adaptado de Muñoz y cols. (2014).

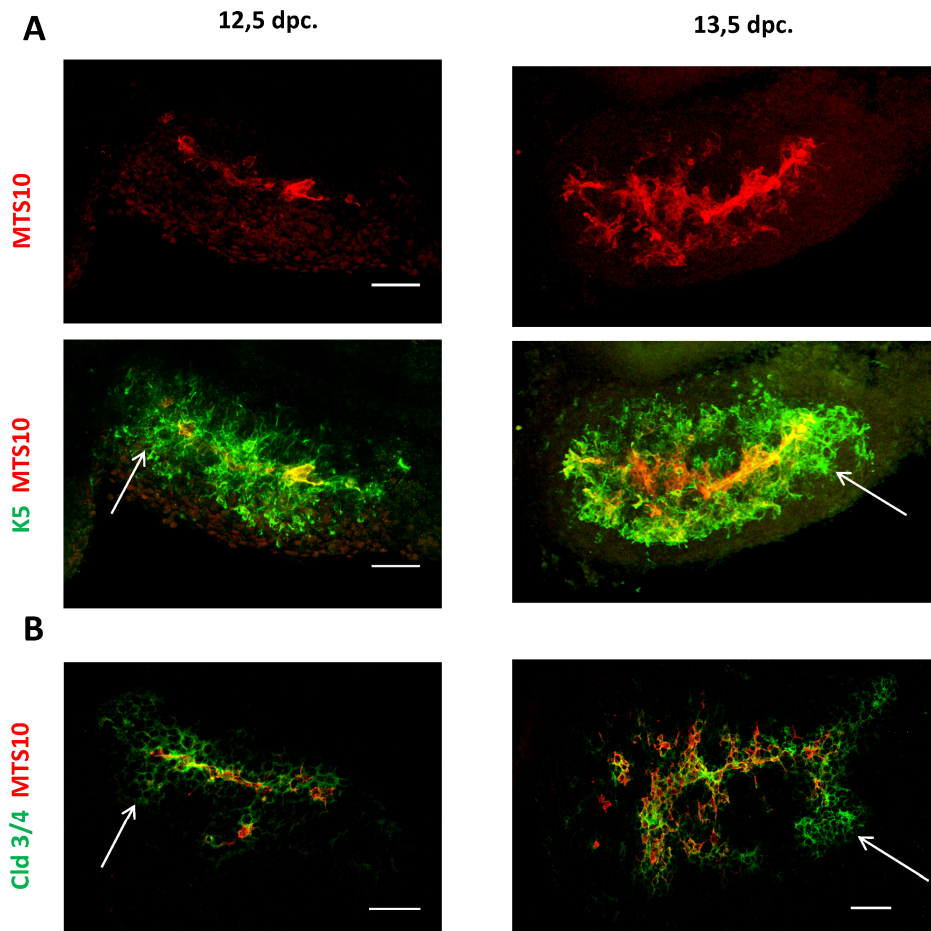


Figura 8. El compartimento medular tímico es continuo desde su origen y se desarrolla en dirección proximal distal a partir de las células $K5+Cld3/4+$ que delimitan el lumen. **A.** Proyecciones de máxima intensidad de lóbulos tímicos de 12,5 dpc. y 13,5 dpc. procesados para inmunodetección “in toto” de K5 (verde) y MTS10 (rojo). **B.** Criosecciones inmunomarcadas para Cld3/4 (verde) y MTS10 (rojo). Se observa que los extremos de las ramificaciones $K5+MTS10^-$ son $Cld3/4+$ (flechas). Barras de escala: 50 μm . Adaptado de Muñoz y cols. (2014).

En consonancia con esto, el timo de ratones *Nude* (*FoxN1* $-/-$) se desarrolla como una estructura tubular ramificada en la que se distinguen tanto componentes ductales como acinares (Dooley y cols., 2005b). En estos ratones, las primeras etapas del desarrollo parecen ocurrir normalmente y la expresión de Cld3/4 es similar a la del timo *wt* (Nowell y cols., 2011), de acuerdo con su papel en el establecimiento de uniones estrechas en la capa de células luminales. Además, tanto en ausencia de *FoxN1* en el epitelio medular como en el caso de deficiencia de timocitos, las estructuras luminales quísticas son más evidentes (van Ewijk y cols., 1999; van Ewijk y cols., 2000; Vroegindeweij y cols., 2010; Guo y cols., 2011). Así, esta disposición luminal

o con tendencia a la formación de quistes de las células medulares se ha descrito como una vía predeterminada de diferenciación epitelial en ausencia de timocitos (*Vroegindeweij y cols., 2010*). De hecho, mutantes portadores de deleciones de ephrinas B1 o B2 condicionadas a timocitos dan lugar a médulas quísticas en las que diferentes tipos de quistes parecen estar relacionados con diferentes estadios de diferenciación y expansión de la médula (*Cejalvo y cols., 2014*). Según este modelo, la formación o el crecimiento del lumen a través de la polarización de las células no lumbinales a lo largo de un eje a partir de la formación de clústeres de polarización y de microlúmenes inicialmente desconectados, como se describe en el páncreas, podría explicar la formación de islotes medulares y su coalescencia descritos por otros autores (*Rodewald y cols., 2001*), de acuerdo a un mecanismo regulado que implicaría, por otra parte, una diferenciación asimétrica de corteza y médula.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A tenor de los datos disponibles, el modelo propuesto para explicar el origen y desarrollo de las TEC no satisface todas las expectativas abiertas en los últimos años acerca de la existencia de progenitores aparentemente comprometidos con el linaje cortical pero con capacidad de diferenciar el medular, los mecanismos de organización histológica de corteza y médula y la relevancia que tienen los acontecimientos que suceden al comienzo de la organogénesis para el posterior desarrollo de un epitelio inmunológicamente funcional. Como se ha explicado en la *Introducción*, recientemente propusimos que la organogénesis tímica se basaba o contenía aspectos típicos de un patrón de desarrollo de morfogénesis ramificada similar al seguido por otros órganos epiteliales que sufren ramificación (*Muñoz y cols., 2014*). Según este patrón la médula tímica surge a partir de células formadoras de lumen, que expresan K5 y Cld3/4 desde estadios muy tempranos, y que forman una estructura ramificada. Sin embargo, finalmente, el timo no presenta un lumen, aunque se mantiene la estructura ramificada de la médula, ni tampoco evoluciona dando lugar a estructuras diferenciadas distalmente típicas de órganos epiteliales ramificados que desarrollan túbulos, acinos, etc., sino que esta estructura de yema epitelial se organizará en los dos compartimentos, corteza y médula, que se diferencian de forma concéntrica y se estructuran en una red tridimensional típica del timo (*Muñoz y cols., 2014*).

Algunos datos previos apuntaban a que este patrón de desarrollo basado en una morfogénesis ramificada y de formación de lumen existía en ratones *Nude*, por lo que podría especularse que constituía la estructura de partida sobre la cual, la presencia de FoxN1 y células linfoides, ambos ausentes en ratones *Nude* y considerados imprescindibles para el desarrollo tímico (*Nehls y cols., 1996; Balciunaite y cols., 2002; Romano y cols., 2013*), modelarían el desarrollo del timo normal.

Así pues, planteamos como hipótesis de trabajo que el desarrollo del timo se fundamenta en un patrón básico de morfogénesis ramificada al que se superpone el programa de diferenciación epitelial específico del timo, determinado fundamentalmente por la expresión de FoxN1 y por la llegada de precursores linfoides, que lo modifican. La diferenciación corteza y médula estaría regulada o fundamentada igualmente en este patrón de desarrollo.

Con el fin de verificar esta hipótesis, hemos planteado un estudio desde la perspectiva organogénica y de diferenciación celular con un abordaje del tipo de ganancia de funciones, donde se plantean como objetivos parciales:

1. La determinación del patrón de desarrollo del timo *Nude*, carente de los dos elementos fundamentales para la diferenciación epitelial tímica. El factor de transcripción FoxN1 y los linfocitos.
2. La determinación del efecto de la expresión de FoxN1 sobre este desarrollo epitelial básico mediante el análisis de timos alinoides *NSG* e *Ikaros* *-/-* prenatales y la relación entre el patrón morfogénico y la adquisición del fenotipo funcional tímico.
3. La determinación del efecto de la colonización linfoide sobre aquellos inducidos por FoxN1 mediante el análisis de timos *Ikaros* *-/-* que se desarrollan en ausencia de células linfoides hasta el nacimiento y son colonizados a los tres días de vida postnatal por precursores linfoides de médula ósea, evaluándose las modificaciones que los timocitos introducen sobre el patrón estructural y funcional tímico.
4. La evaluación de las modificaciones inducidas por FoxN1 y las células linfoides en los modelos anteriores en el desarrollo del timo wildtype, donde ambos factores están presentes desde el principio en el desarrollo y de manera simultánea y no secuencial.

Material y Métodos

1. Animales de experimentación.

En el presente estudio se utilizaron distintas cepas de ratones mutantes, cuyas mutaciones afectaban, de un modo u otro, al desarrollo del timo. Por una parte, se emplearon ratones inmunodeficientes *Nude* (*Athymic Nude-Foxn1^{nu}*; *Athymic Nude Mice*) (*Harlan Laboratories*, España). Éstos presentan una mutación autosómica recesiva en el alelo *nu*, situado en el cromosoma 11. Los ratones homocigotos para la mutación presentan un rudimento epitelial tímico no funcional y carecen de linfocitos T, pero si presentan un linaje y funcionalidad normal de linfocitos B (*Cordier y Heremans, 1975; Nehls y cols., 1996*). Fenotípicamente carecen de pelo, aunque pueden presentar algunas zonas con pelo muy delgado. Los ratones heterocigotos para la mutación son fenotípicamente normales e inmunocompetentes.

Por otro lado, también se utilizaron ratones inmunodeficientes *NOD SCID gamma* (*NSG* (*NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*)), (*Charles River*, Francia). Este ratón mutante combina las características de la cepa *NOD/ShiLtJ* (*The Jackson Laboratory*), lo que provoca numerosas deficiencias en la inmunidad innata, la mutación *SCID* (*Severe Combined Immune Deficiency Mutation*) y una deficiencia a nivel de la cadena *gamma* del receptor IL2. En consecuencia, los ratones *NSG* no presentan células T, B ni NK maduras y son deficientes en múltiples vías de señalización de citocinas (*Shultz y cols., 2005*).

Así mismo, se utilizaron ratones inmunodeficientes *Ikaros null/null* (*Ikaros -/-* a partir de ahora). Ratones con la mutación en heterocigosis (*Ikaros +/-*) fueron cedidos por el Dr. Joseph Canals (Universidad de Barcelona, España), originalmente en *background C57BL6*, que se mantuvo en nuestra colonia. A través de cruzamientos de padres heterocigotos se obtuvieron los ratones homocigotos (*Ikaros -/-*) para la mutación. Por tanto, como controles de los experimentos, se utilizaron ratones con el mismo *background* genético procedentes de las mismas camadas. *Ikaros* es un factor de transcripción esencial para la especificación del linaje linfóide. Los ratones *Ikaros -/-* carecen de la proteína *Ikaros* y de precursores T fetales, aunque presentan diferenciación normal de otros linajes en la vida fetal. Postnatalmente contienen precursores linfoides procedentes de la médula ósea que colonizan el timo y sufren una diferenciación T anormal que conlleva un aumento del número de timocitos CD4

SP con respecto a la condición del timo *wt*, pero que permiten el desarrollo de los compartimentos cortical y medular en estadios postnatales (Wang y cols., 1996).

Por otro lado, además de los ratones *wildtype* utilizados como controles definidos anteriormente, se utilizaron ratones *wildtype* de *background* genético *CD1* y *Balb/c* (Harlan Laboratories, España).

Todos los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, más estrictas en el caso de los animales inmunodeficientes, en los estabularios de las Facultades de Biología y Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (U.C.M.).

Para todos los estudios de desarrollo, el día cero de gestación fue determinado como el primer día en el que las hembras presentaron esperma en el frotis vaginal, momento a partir del cual las hembras preñadas fueron separadas en jaulas individuales.

1.1. Detección de los alelos mutantes.

Una vez generada la progenie de los cruces de ratones heterocigotos *Ikaro* $-/+$, obtenida para identificar la cepa de *Ikaro* $-/-$, se aisló ADN de los animales obtenidos en los cruzamientos y posteriormente se detectaron los alelos *wildtype* y mutante para *Ikaro* mediante amplificación por PCR de ADN genómico.

1.1.1. Aislamiento de ADN.

El ADN genómico se obtuvo a partir de fragmentos de cola, que se lisaron mediante incubación en tampón de extracción (Anexo I) y proteinasa K (0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Roche Diagnostics, Alemania), a 60 °C, durante toda la noche en agitación. A continuación, se precipitaron las proteínas y los restos celulares mediante la adición de 1/3 volúmenes de una solución de acetato potásico 5M (Anexo I), agitación hasta conseguir una suspensión homogénea con ambas soluciones, incubación en hielo durante 10 min. y centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y el ADN se precipitó añadiendo 0,8 volúmenes de isopropanol (Panreac S.A., Barcelona, España) en agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C y se retiró el

sobrenadante. Los pellets de ADN resultantes fueron lavados en etanol al 70% a -20°C, agitando cuidadosamente. Una vez retirado el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol residual a temperatura ambiente (TA) y a continuación, el ADN fue hidratado y resuspendido en agua Milli-Q estéril.

1.1.2. PCR.

Se amplificaron mediante PCR secuencias específicas de los alelos de interés, para identificar los ratones mutantes *lkaros* $-/-$. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en esta reacción fueron sintetizados por *Sigma-Genosys* (*Sigma-Genosys Ltd*, Cambridgeshire, Reino Unido) (Anexo II, Tabla 1).

Todas las PCR se realizaron en un termociclador *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemania) usando la enzima Taq ADN polimerasa (*Biotools*, Madrid, España). Los productos de las PCR se mezclaron con tampón de carga (Anexo I) y se resolvieron en geles de agarosa (*Biotools*, Madrid, España) al 2% diluida en TAE (Anexo I), que se tiñeron con bromuro de etidio. Posteriormente, fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (*Bio-RAD*, Barcelona, España), adquiriendo las imágenes con el programa informático *Quantity One*. Como referencia de tamaño se usó un patrón de peso molecular de ADN 0.019-1.11 Kb (*Marker VIII*, *Roche Diagnostics*, Alemania), comprobándose que el tamaño de los amplicones era el esperado en cada caso (400 pb. para el alelo mutante y 800 pb. para el *wildtype*).

2. Obtención de muestras y suspensiones celulares.

Todos los animales adultos y postnatales se sacrificaron mediante dislocamiento cervical o inhalación de cloroformo. Posteriormente, se procedió a su disección para extraerles el timo. Para la obtención de los lóbulos tímicos de los distintos estadios fetales estudiados, se sacrificaron las madres y se extrajeron los fetos depositándolos en placas con RPMI-1640 enfriadas sobre hielo, procediéndose a su disección.

Todos los protocolos se realizaron en condiciones de esterilidad cuando los órganos iban a ser posteriormente cultivados.

2.1. Suspensiones de células epiteliales tímicas (TECs).

Para la obtención de suspensiones de TECs para su posterior análisis mediante citometría de flujo, lóbulos tímicos de ratones postnatales fueron disgregados mediante digestión con DNasa - Liberasa (0,1 µg/ml, *Roche Diagnostics*, Alemania) diluidas en *RPMI-1640* (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, USA), incubándolos a 37°C durante aproximadamente 10 min.

Para la obtención de la suspensión unicelular, tras la incubación con DNasa - Liberasa, se utilizaron de forma repetida agujas de calibre decreciente, interrumpiendo posteriormente la actividad enzimática diluyendo la suspensión en *RPMI-1640* suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS) previamente descomplementado (56°C, 30 min) (RPMI 10%, Anexo I). La suspensión celular resultante se lavó varias veces en PBS EDTA 5mM y tras ello se realizaron los inmunomarcajes, tal como se indica en el apartado *Caracterización Citofluorimétrica*.

2.2. Conteo celular.

El número total de células de las suspensiones de TECs de timos adultos, se determinó con un hemocitómetro (*Neubauer*), excluyéndose del conteo las células muertas mediante tinción con azul tripán al 0.2% en PBS. La viabilidad celular fue siempre mayor del 90%.

3. Cultivos de lóbulos tímicos.

3.1. Ensayos in vitro con lóbulos tímicos.

Para todos los ensayos se extrajeron lóbulos tímicos de 12,5 dpc., que fueron tratados con colagenasa (200U/ml) (*GIBCO, Life Technologies*) incubándolos 10 min. a 37°C, para eliminar la cápsula tímica con ayuda de una pipeta Pasteur.

Posteriormente, en función del tipo de cultivo, se siguió un procedimiento u otro como se explica a continuación. En todos los casos el medio de cultivo fue DMEM completo (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, USA) (DMEM completo, Anexo I).

3.1.1. Explantes de lóbulo completo en dos dimensiones.

Se recubrieron pocillos de placas de 24 pocillos con una capa de matrigel (*BD biosciences*) en proporción 1:1 con DMEM sin suplementar. La placa de cultivo se introdujo en el incubador a 37°C durante 30 min. para conseguir la polimerización del gel. Pasado este tiempo, y tras tratar los lóbulos con colagenasa como se ha explicado anteriormente, los explantes se sembraron sobre dicha capa de matrigel. Se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad durante 8-9 días, cambiando el medio cada 3 días. Tras este tiempo, se procesaron los lóbulos para su inmunodetección microscópica.

3.1.2. Explantes de fragmentos de lóbulos tímicos en tres dimensiones.

Se siguió el mismo procedimiento para disgregar los lóbulos que en el caso anterior, pero a la hora de sembrarlos se hizo, o bien en resuspensión con matrigel en proporción 1:1 en DMEM, o bien añadiendo matrigel por encima una vez sembrados los fragmentos, dejando éste a una concentración final del 5%. Se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad durante 2-3 días, tiempo tras el que se procesaron los fragmentos de los lóbulos para su inmunodetección microscópica.

3.2. FTOC tratados con factores de crecimiento.

Se extrajeron lóbulos tímicos de fetos de 15,5 dpc., que, sin sufrir la eliminación de la cápsula, se pusieron en cultivo sobre filtros autoclavados de polycarbonato de 8 µm de diámetro de poro (*Millipore Ibérica*, Barcelona, España) que reposaban sobre 500 µl de DMEM suplementado con el factor de crecimiento de interés (DMEM suplementado con factores de crecimiento, Anexo I) en placas de 24 pocillos. Los

cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad durante 7 días, cambiando el medio una vez, a los 3 días. Transcurrido este tiempo, se levantaron los lóbulos del filtro y se procesaron para su inmunodetección microscópica.

4. Análisis de las muestras

4.1. Caracterización citofluorimétrica de distintas poblaciones celulares.

La detección de marcadores moleculares de superficie se realizó empleando alícuotas, que contenían al menos entre 0.2–0.4 x 10⁶ células de las distintas suspensiones celulares a analizar. Dichas alícuotas se incubaron durante 20 minutos, a 4°C, con concentraciones saturantes de anticuerpos conjugados directamente a un fluorocromo (FITC, PE, PerCP-Cy-5.5, Tricolor o APC) o bien, en algunos casos, incubando con anticuerpos primarios, y, posteriormente, con anticuerpos secundarios unidos a fluorocromo (Anexo III, Tablas 1 y 3). La incubación se realizó en hielo durante 30 min. y en PBS EDTA 5mM. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS 1% FCS (Anexo I) y se centrifugaron durante 5 min. a 1500 r.p.m. A continuación, se resuspendieron en PBS 1% FCS y se analizaron en un citómetro de flujo FACS_{CALIBUR} (BD Immunocytometry systems, California, USA) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la U.C.M. La población de células epiteliales se definió para el análisis de acuerdo con sus parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC).

4.2. Análisis microscópico de criosecciones tímicas.

4.2.1. Obtención de criosecciones.

Tras ser limpiados cuidadosamente con unas pinzas, los fetos o timos extraídos fueron embebidos en medio crioprotector específico para tejidos OCT Tissue-Tek (Casa Álvarez, España). Acto seguido, los tejidos fueron congelados por inmersión en nitrógeno líquido, conservándolos hasta su procesamiento a -80°C.

Empleando un criostato (*Leica 1850*, Heidelberg, Alemania) a $-20/-22^{\circ}\text{C}$, se obtuvieron crio secciones de 8-10 μm de grosor que se recogían en portaobjetos de vidrio. Las crio secciones se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente (TA) y pasado ese tiempo se fijaron sumergiéndolas 10 min. en acetona.

A partir de este punto se podía, o bien continuar con la inmunodetección, o bien congelar las muestras en cajas para preparaciones histológicas a -80°C en condiciones de mínima humedad para usarlas posteriormente.

4.2.2. Inmunodetección microscópica.

Las secciones obtenidas, previamente fijadas, se rehidrataron en PBS frío durante 5 min. y posteriormente se bloqueó la posible unión inespecífica de los anticuerpos mediante incubación con PBS al 5% de suero de burro (*Santa Cruz Biotechnology*, California, USA) durante 10 min. a TA. Tras esto, las preparaciones histológicas fueron lavadas con PBS a 4°C durante 5 min. e incubadas durante 1 hora a TA con los anticuerpos primarios (Anexo III, tabla 2) diluidos en PBS al 1% de BSA en cámara húmeda. A continuación, las muestras fueron lavadas tres veces durante 5 min. con PBS a 4°C y tras ello fueron incubadas, cuando correspondía, durante 45 min. a TA con los anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos (Anexo III, tabla 3) diluidos en PBS al 1% de BSA y en cámara húmeda. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron nuevamente 3 veces durante 5 min. con PBS a 4°C .

En los casos en los que en una misma preparación se emplearon anticuerpos anti-E-cadherina y anti-DEC205, o anti-K8 y anti-CD80, obtenidos en la misma especie (rata), se incubó primeramente uno de ellos y posteriormente su secundario. A continuación, se bloqueó el anticuerpo anti-rata libre incubando las muestras con PBS al 2% de suero de dicha especie, incubando tras esto el otro primario y secundario, en caso de ser necesario, como se ha descrito.

Las muestras fueron montadas con medio protector para fluorescencia *Prolong Gold Antifade* (*Invitrogen*, Oregon, USA), y se examinaron en un microscopio Confocal *Leica SP2* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemania) del *Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la U.C.M.* La adquisición de las imágenes se realizó

mediante el programa *Leica Confocal Software* y su análisis mediante el programa *Image J* (Schneider y cols., 2012).

4.3. Inmunodetección sobre criosecciones histológicas gruesas.

Fetos o timos embebidos en medio crioprotector específico para tejidos *OCT Tissue-Tek* (Casa Álvarez, España) y conservados a -80°C fueron procesados en criostato (*Leica 1850*, Heidelberg, Alemania), a una temperatura de -16/-18°C, obteniendo criosecciones de 100 a 120 µm de grosor. Las secciones fueron depositadas sobre portaobjetos recubiertos con poli-lisina (*Polysine*, Menzel-Gläser, Alemania) previamente enfriados a -20°C, sobre los que se había preparado con cinta de doble cara adhesiva una pequeña cámara que permitía que la sección no fuera dañada al poner un cubreobjetos encima.

Las secciones, ya depositadas en los portaobjetos y cubiertas por cubreobjetos, fueron directamente depositadas en el fijador (40% metanol: 40% acetona: 20% DMSO), donde se dejaron toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron cuidadosamente 4 veces durante 15 min. en PBS a 4°C para eliminar los restos de fijador. A continuación, a TA y en cámara húmeda, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios, diluidos en PBS al 5% de BSA. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron 3 veces durante 5 min. en PBS y fueron incubadas con los anticuerpos secundarios, diluidos también en PBS al 5% de BSA, durante 2 horas a TA. A continuación fueron lavados y finalmente montados en medio de montaje protector de la fluorescencia *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen, Oregon, USA).

La adquisición de imágenes se realizó mediante el programa *Leica Confocal Software* en un microscopio Confocal *Leica SP2* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemania) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la U.C.M. Para el procesamiento de las imágenes y montaje de los stacks y superficies se utilizó el programa *Fiji* (Schindelin y cols., 2012).

4.4. Inmunodetección sobre órgano completo ("in toto").

Lóbulos tímicos de estadíos fetales tempranos fueron lavados en PBS y fijados en formaldehído al 4% o en metanol-acetona-DMSO 2:2:1 durante toda la noche. Posteriormente se lavaron 3 veces en PBS, durante 5 min. y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 3% en PBS durante 15 min. Tras eliminar el permeabilizador en PBS (3 lavados de 5 min.), se incubó cada lóbulo en suspensión con el anticuerpo primario en concentración saturante diluido en PBS Tritón X-100 al 0,01% y BSA al 5%, dejándolo toda la noche. Transcurrido este tiempo, los lóbulos se lavaron 3 veces durante 5 min. en PBS y fueron incubados con los anticuerpos secundarios, diluidos también en PBS Tritón X-100 al 0,01% y BSA al 5%, durante toda la noche. A continuación fueron lavados y el marcaje postfijado con formaldehído al 2%.

Finalmente se montaron en medio de montaje para inmunofluorescencia *Prolong gold antifade (Invitrogen, Oregón, EEUU)* en cubreobjetos sobre los que se habían preparado pequeñas cámaras con cinta adhesiva de doble cara, que permitían que el lóbulo quedara embebido en el medio de montaje sin ser aplastado por el cubreobjetos.

Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio *Confocal Leica SP2* del *Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la U.C.M.* mediante el programa *Leica Confocal Software*. Para el procesado de las imágenes y montaje de los stacks y superficies se utilizó el programa **Fiji**, antes indicado.

4.5. Reconstrucciones tridimensionales a partir de criosecciones tímicas.

Se obtuvieron criosecciones seriadas de 10 μm de grosor de timos completos, tanto fetales como postnatales, como se describe en el apartado *Obtención de criosecciones* y se procedió a su *Inmunodetección Microscópica* como se describe en dicho apartado. Una vez adquiridas las imágenes con un microscopio *Confocal Leica SP2* mediante el programa *Leica Confocal Software*, se procedió a su procesamiento mediante los programas **Fiji** (Schindelin y cols., 2012) y **Reconstruct** (Fiala, 2005).

Se generó un stack con las imágenes obtenidas, sobre el que se alinearon las secciones con uno de los dos programas mencionados anteriormente. En el caso del

programa *Fiji* el alineamiento se realizó mediante el *plugin StackReg* (Thevenaz y cols., 1998). Una vez hecho esto, se realizaron las reconstrucciones tridimensionales. Para generar las reconstrucciones tridimensionales correspondientes al marcaje de E-cadherina, una vez alineadas las secciones, se suavizaron y definieron los bordes del timo mediante la herramienta *Remove Outliers*, binarizado de la imagen y suavizado en 3D (“smooth” 3D) del stack resultante. A continuación se generó el volumen tridimensional. Para generar un modelo simplificado de la estructura, tras suavizar los bordes y binarizar la estructura igual que en caso anterior, se aplicó un “smooth” en 2D y se generó la superficie tridimensional del stack obtenido tras ello. Para realizar las reconstrucciones tridimensionales correspondientes al marcaje de Cld3/4, se pintaron los huecos (lúmenes) de las imágenes originales alineadas, generando a continuación el volumen tridimensional tanto de los lúmenes únicamente (huecos pintados) como del resto del marcaje de Cld3/4, como de una combinación de ambos. Todas las reconstrucciones tridimensionales, tanto volúmenes como superficies, se generaron con el *plugin 3D Viewer* (Schmid y cols., 2010).

4.6. Estudios de colocalización y cuantificación.

Se obtuvieron criosecciones seriadas de 10 μm de grosor como se describe en el apartado *Obtención de criosecciones* y se procedió a su *Inmunodetección microscópica* como se describe en dicho apartado. A continuación se procedió, tras normalizar a un nivel cero de *background* las imágenes obtenidas, a realizar la colocalización de las poblaciones de interés mediante el *plugin Colocalization Threshold* (MBF Plugin Collection, Toni Collins, 2009) del programa *Fiji*. En los casos en los que fue necesario, a partir de los mapas de píxeles obtenidos con las colocalizaciones, se obtuvieron las poblaciones celulares simples, dobles o triples positivas mediante el uso de las herramientas matemáticas adecuadas (*Image Calculator*) también del programa *Fiji*.

En el caso de los estudios de cuantificación, tras normalizar a un valor cero de *background* las imágenes obtenidas tras su inmunodetección microscópica para Cld3/4 y E-cadherina, se realizó una segmentación de las mismas mediante el *plugin Trainable Weka Segmentation* (Hall, M. (2009); *The WEKA Data Mining Software: An Update*;

SIGKDD Explorations, Volume 11, Issue 1) del programa *Fiji*, generando finalmente una imagen en la que se distinguían dos zonas, la Cld3/4+ y la Cld3/4-. A continuación, y mediante la herramienta *Analyze Particles* se contaron, por un lado, todos los núcleos celulares y, por otro, los núcleos en ciclo presentes en cada una de las zonas generadas con la segmentación. Por último, se procesaron estadísticamente todos los datos obtenidos, representando finalmente las medias de los porcentajes en un gráfico de barras.

ANEXO I.

Tampones y soluciones. (Todos los compuestos fueron adquiridos a *Panreac S.A.*)

Tampón PBS

500 ml de H₂O destilada
0,356 g PO₄H₂Na
1,192 g PO₄HNa₂
Ajustar el pH a 7.2
8,776 g NaCl
Enrasar a 1000 ml con H₂O Milli-Q

Tris-Acetato EDTA (TAE) 50x.

242 g Tris base
57,1 ml ácido acético glacial
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Enrasar a 1000 ml con H₂O Milli-Q

Acetato potásico ADN.

60 ml de Acetato Potásico 5 M
11,5 ml de Ácido Acético Glacial
28,5 ml de H₂O Milli-Q

Tampón extracción ADN.

50mM Tris-HCl (pH 8.0)
1% SDS
100 nM NaCl
100mM EDTA (pH 8.0)

Tampón de carga PCR.

20 ml de H₂O destilada
20 ml de glicerol
0,1 g de Azul de bromofenol
0,1 g de Naranja de acridina
0,1 g de Cianol xileno

Medios de cultivo. (Todos los compuestos, excepto los específicamente indicados, fueron adquiridos a *Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, USA). En todos los casos en los que se emplea, el suero fetal de ternera (FCS) fue previamente descomplementado por calentamiento (56°C, 30 min.).

DMEM completo

DMEM
2 µg/ml EFG
5 µg/ml Insulina
0,5 µg/ml Hidrocortisona

RPMI 10%

RPMI-1640
10 % FCS
100 µg/ml Estreptomicina
100 U/ml Penicilina

DMEM suplementado con factores de crecimiento

DMEM

100 µg/ml Estreptomicina

100 U/ml Penicilina

Beta –mercaptoetanol en proporción 1:1000

Uno de los siguientes Factores de crecimiento

- EGF 100ng/ml
- FGF7 500ng/ml (*R&D Systems, Vitro, Madrid, España*)
- FGF10 500ng/ml (*R&D Systems, Vitro, Madrid, España*)

ANEXO II.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados como cebadores para la detección por PCR del genotipo de los animales.

Moléculas diana		Secuencia de los oligonucleótidos	Alelo amplificado	Tamaño Amplicón (pb)	Tª (°C)
<i>Ikaros</i>	27	5'- GGGCCTTTGGGGACATCGAAGGTC – 3'	27 + 3 <i>wt</i>	800	66
	3	5-CATAGGGCATGTCTGACAGGCACTTGT- 3'	27 + Neo1 <i>Ikaros -/-</i>	400	66
	Neo 1	5'- CCAGCCTCTGAGCCCAGAAAGCGA -3'			

Programas de PCR empleados: Detección de dianas: 95°C, 5min. + (94°C, 1min + 66°C, 1min. + 72°C, 1min.) x 35 repeticiones + 72°C, 10min. + mantener a 4°C.

ANEXO III.

Tabla 1. Anticuerpos empleados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Clon	Casa Comercial
EpCAM	G8.8	<i>BD</i>
CD45	30-F11	<i>BD</i>
UEA	-	<i>Vector Labs.</i>
CD80	16-101A1	<i>Biolegend</i>
LY51	6C3	<i>BD</i>
MTS20	MTS20	Cedido por Dr. Boyd
DEC205	NLDC-145	<i>Abcam</i>
RT1B	OX-6	<i>Biolegend</i>

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia

Anticuerpo	Clon	Huésped	Casa comercial
Keratina 5	Policlonal	Rabbit	<i>Covance</i>
Keratina 8	Troma-1	Rat	<i>Hybridoma Bank</i>
Pan-Citoqueratina	C11	Mouse	<i>Sigma</i>
MHC-II (I-A/I-E)	2G9	Rat	<i>BD</i>
MTS10	MTS10	Rat IgM	<i>Cedido por Dr. Boyd</i>
UEA	-	-	<i>Vector Labs.</i>
CD45	30-F11	Rat	<i>Biolegend</i>
Claudina 3	Policlonal	Rabbit	<i>Invitrogen</i>
Claudina 4	Policlonal	Rabbit	<i>Invitrogen</i>
E-cadherina	ECCD-2	Rat	<i>Invitrogen</i>
DEC-205	NLDC-145	Rat	<i>Abcam</i>
RT1B	OX-6	Mouse	<i>Biolegend</i>
AIRE	SH12	Rat	<i>eBioscience</i>
KI-67	Policlonal	Goat	<i>Santa Cruz</i>
CD80	16-101A1	Rat	<i>Biolegend</i>

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Fluorocromo	Casa comercial
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa 488	<i>Invitrogen</i>
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa 546	<i>Invitrogen</i>
Donkey anti-Rabbit IgG	Alexa 647	<i>Invitrogen</i>
Donkey anti-Rat IgG	Biotinado	<i>Jackson Immun.</i>
Donkey anti-Rat IgG	Alexa 594	<i>Invitrogen</i>
Donkey anti-Rat IgG	Alexa 647	<i>Invitrogen</i>
Goat anti-Rat IgG	Alexa 546	<i>Invitrogen</i>
Goat anti-Rat IgM	Alexa 488	<i>Invitrogen</i>
Goat anti-Rat IgM	Alexa 594	<i>Invitrogen</i>
Donkey anti-Goat IgG	Alexa 488	<i>Invitrogen</i>
Streptavidin	Alexa 594	<i>Invitrogen</i>
Streptavidin	Alexa 488	<i>Invitrogen</i>
Streptavidin	Alexa 405	<i>Invitrogen</i>

Resultados

1. Desarrollo del epitelio tímico en ausencia de FoxN1: Estudio de ratones *Nude*.

A pesar de la creencia generalizada de que el epitelio del timo de ratones *Nude* puede representar una población de células epiteliales tímicas progenitoras, sigue sin estar bien definido y tiene poca semejanza con el epitelio del timo normal. Se entiende que la ausencia de FoxN1 hace que el esbozo tímico inicial, a partir de un determinado momento del desarrollo, evolucione como una estructura quística aberrante. El timo *Nude* posee numerosas estructuras quísticas tapizadas por epitelio que varía entre escamoso, columnar o pseudo-estratificado, y contiene células ciliadas y células epiteliales productoras de mucus. Se ha descrito también una organización glandular de algunas zonas de este epitelio asociado con las estructuras quísticas (Cordier, 1974), y la expresión en él de algunas moléculas asociadas con el epitelio cortical y/o medular (Van Vliet y cols., 1985; Blackburn y cols., 1996), pero no expresa moléculas MHC de clase II (Kingston y cols., 1984) u otras implicadas en interacciones celulares críticas para la diferenciación funcional de los timocitos (Bleul y Boehm, 2001).

Partiendo, por tanto, de la idea de que el epitelio tímico *Nude* representa un estado celular primitivo o, más probablemente, un estadio epitelial “primigenio” en el que se basaría su posterior diferenciación, analizamos el desarrollo del timo *Nude* para determinar si supone un programa básico de desarrollo sobre el que se superpone el programa de desarrollo específico del timo, determinado fundamentalmente por la expresión de FoxN1 y la presencia de precursores linfoides, con el fin de identificar qué aspectos de su desarrollo, y cuáles no, se modifican o reproducen en mayor o menor medida en el timo *wt*.

1.1. El timo *Nude* postnatal es una estructura tubular ramificada y continua.

Analizamos, por tanto, en primer lugar la estructura histológica del timo de ratones *Nude* “jóvenes” postnatales de 15 días, estadio que se considera el final del desarrollo fetal y postnatal tímico en ratones *wt* y el comienzo de su condición adulta.

Dooley y cols. (Dooley y cols., 2005b) habían descrito que el rudimento tímico *Nude* contenía dos compartimientos epiteliales distintos. Un compartimiento que se

compone de grandes quistes llenos de líquido limitados por células epiteliales y otro compartimento glandular que se encuentra normalmente a lo largo de las zonas periféricas de los quistes. Tanto estos autores como Cordier (Cordier, 1974), describieron que el epitelio de revestimiento de los quistes tiene una morfología variada que oscila entre escamosa y columnar, con grupos dispersos de células ciliadas. Todo el rudimento está embebido en una masa de tejido adiposo unilocular. Mediante reconstrucciones de secciones seriadas, Dooley y cols. (Dooley y cols., 2005b) demostraron que el compartimento quístico dentro del rudimento tímico *Nude* está organizado como una sola unidad, con múltiples sáculos y canales interconectados. No obstante, este es el único trabajo que describe la estructura histológica del órgano y, en general, se sigue hablando del timo *Nude* como de un epitelio quístico.

Con el fin de identificar el patrón histológico de los timos *Nude* postnatales de 15 días realizamos cortes seriados que fueron teñidos con E-cadherina (componente de uniones adherentes y marcador de todo el epitelio tímico *Nude*) (Takeichi, 1988) y una mezcla de claudinas 3 y 4 (Cld3/4), componentes de uniones estrechas que se sitúan en la parte apical de la membrana lateral para definir la función de barrera del epitelio y separan la membrana apical de la basolateral (Lal-Nag y Morin, 2009).

Esta tinción definió un epitelio que variaba de monoestratificado a pluriestratificado plano o cúbico que limitaba lúmenes/quistes de tamaño variable delimitados por células que mostraban un marcaje polarizado de Cld3/4 (Cld3/4^{hi}) (fig. 9 A, B). También podían definirse zonas de aspecto acinar formadas por pequeños túbulos ramificados (fig. 9 C).

El aspecto morfológico del timo variaba en función de la orientación de los cortes; el aspecto eminentemente cístico que ofrecían los cortes tangenciales o transversales (fig. 9 A izquierda) se convertía en una estructura elongada y ramificada en cortes longitudinales tanto dorso-ventrales como sagitales (fig. 9 A centro y derecha). Las reconstrucciones tridimensionales a partir de criocortes de estos timos revelaban la naturaleza continua y ramificada de los mismos (fig. 10). Esta organización ramificada del timo definía un lumen interior que resultaba continuo a lo largo de todo el sistema de túbulos, sáculos y acinos (fig. 10), limitado por las membranas apicales de las células epiteliales y sellado mediante uniones estrechas que expresan Cld3/4

(figs. 9, 10). Un análisis en mayor detalle confirmaba la naturaleza continua y ramificada del lumen también en las zonas acinares (fig. 11).

Así pues, aunque establecer un patrón preciso de la estructura del timo *Nude* es difícil, sí podemos definir algunas características generales de dicho patrón. El timo *Nude* a esta edad puede describirse como una estructura epitelial con una organización ramificada formada por estructuras tubulares más o menos troncales pluriestratificadas que adquieren forma de tubo o sáculo engrosado mono o biestratificado del que parten ramificaciones, en general, monoestratificadas que se subdividen en distintos grados de ramificación. En algunas zonas más o menos constantes entre las distintas muestras tímicas, en las proximidades de los sáculos de mayor diámetro, el sistema de ramificaciones secundario constituía estructuras de aspecto acinar (fig. 12).

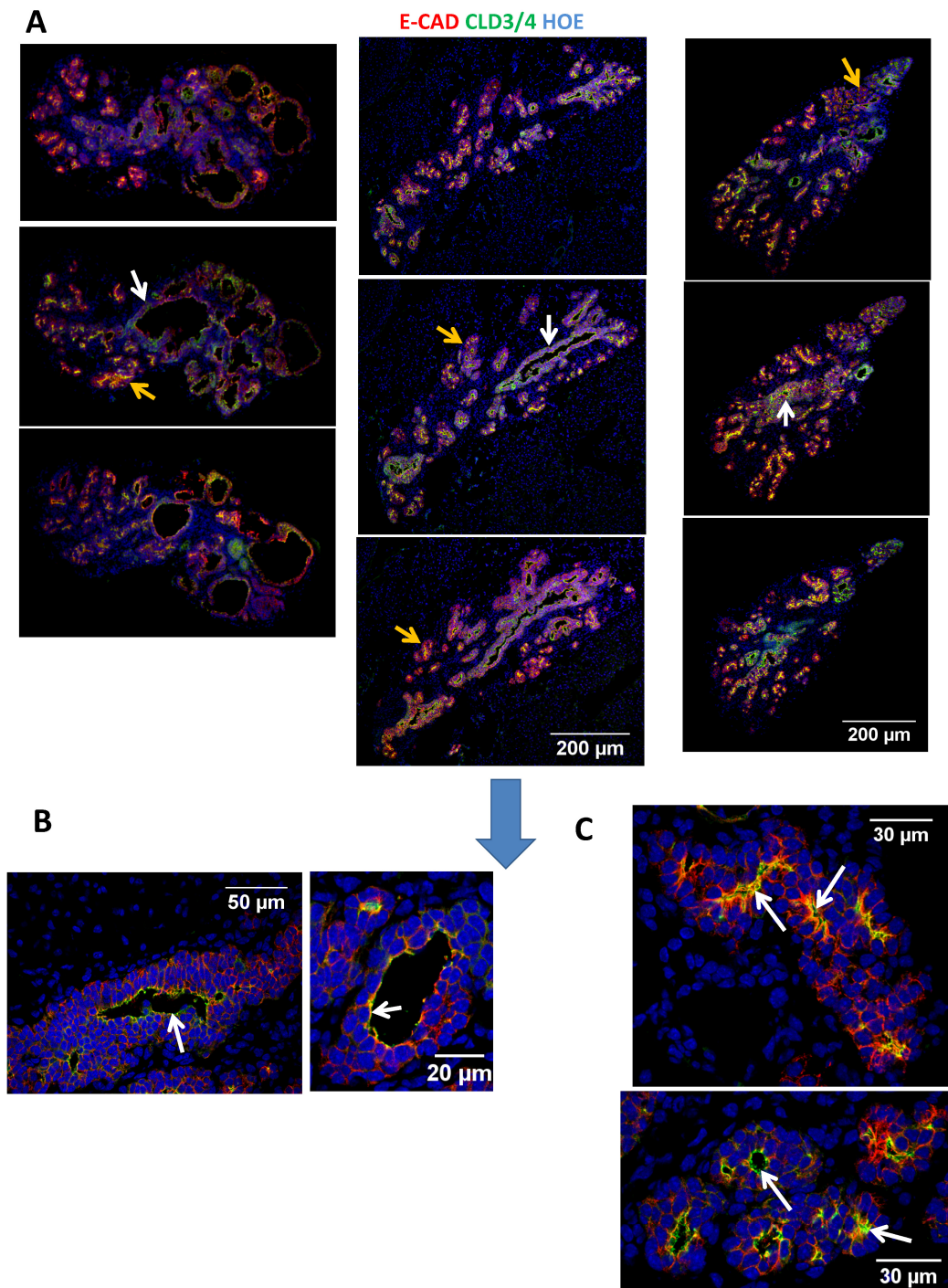


Figura 9. El timo de ratones *Nude* de 15PN es una estructura epitelial formada por un compartimento quístico y otro de aspecto acinar, donde el epitelio se organiza en una o unas pocas capas en torno a un lumen. **A.** Criosecciones de 10 µm a diferente altura de tres lóbulos tímicos distintos *Nude* de 15 días postnatal cortados en orientación coronal (izquierda) sagital (centro) y dorsoventral (derecha), marcadas por inmunohistoquímica para E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Para un mejor alineamiento de las secciones, el marcaje por fuera del lóbulo tímico fue eliminado en las series de la izquierda y la derecha. Se observan zonas donde el epitelio se organiza en torno a lúmenes de tamaño variable (flechas blancas) y zonas de aspecto acinar (flechas amarillas). **B.** Ampliaciones correspondientes a las zonas marcadas con flechas blancas en A. Las flechas marcan la polarización del marcaje de Cld3/4 en torno al lumen, estando el epitelio organizado desde mono a pluriestratificado en torno al mismo. **C.** Ampliaciones correspondientes a las zonas marcadas con flechas

amarillas de la figura A. Se observan pequeños lúmenes delimitados por un marcaje Cld3/4^{hi} (flechas), con las células organizadas en mono o bicapa alrededor de los mismos. B y C. Proyecciones de máxima intensidad correspondientes a las zonas marcadas con flechas blancas (B) o amarillas (C) de la figura A, resultantes de la proyección en el eje z de secciones obtenidas mediante escaneo por microscopía confocal con un objetivo HCX PL APO 10x1.40 OIL de criosecciones de 10 µm con una separación de 0,1 µm entre secciones.

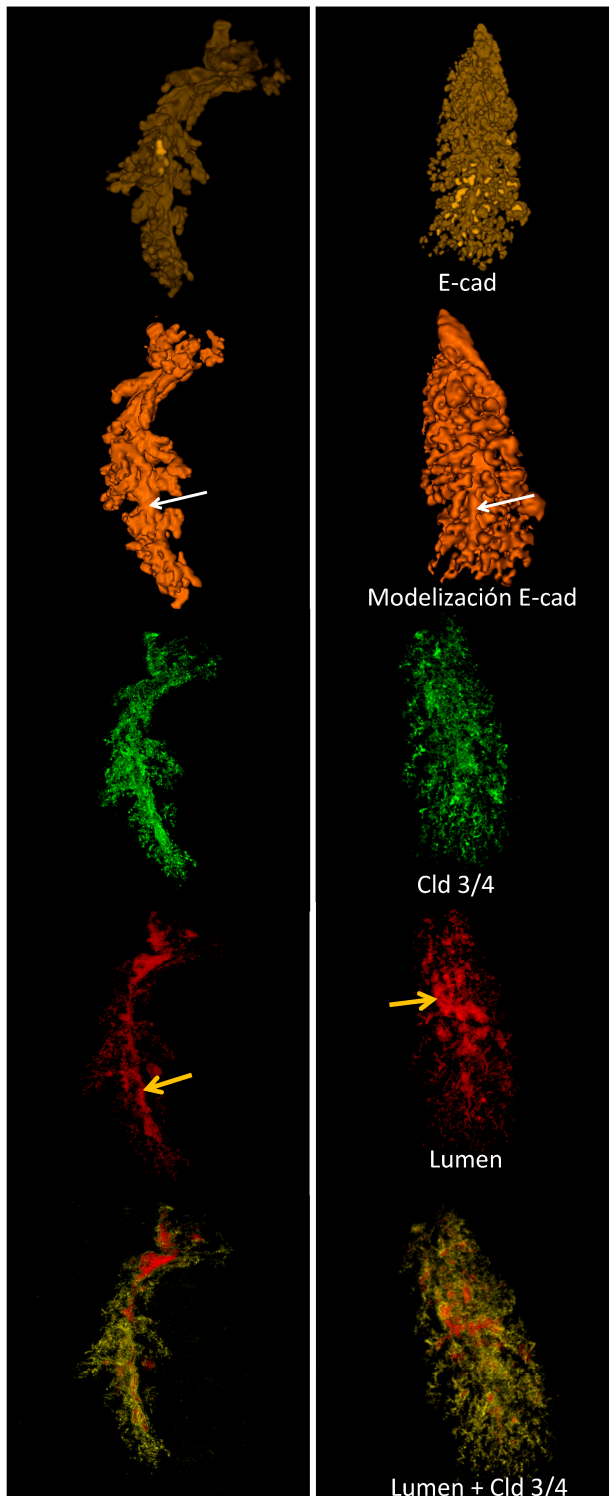


Figura 10. El timo adulto Nude es una estructura ramificada. Se muestran reconstrucciones tridimensionales obtenidas de series de cortes de 15 días postnatal de timos Nude en orientación sagital (izquierda) y dorsoventral (derecha). Criosecciones seriadas de 10 µm fueron procesadas para inmunodetección de E-cad y Cld3/4 y analizadas por microscopía confocal con objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Los lúmenes se rellenaron en color rojo para su reconstrucción. Las reconstrucciones muestran que el timo Nude es una estructura ramificada con un eje troncal (flechas blancas) del que parten ramificaciones organizadas en torno a un lumen continuo (flechas amarillas).

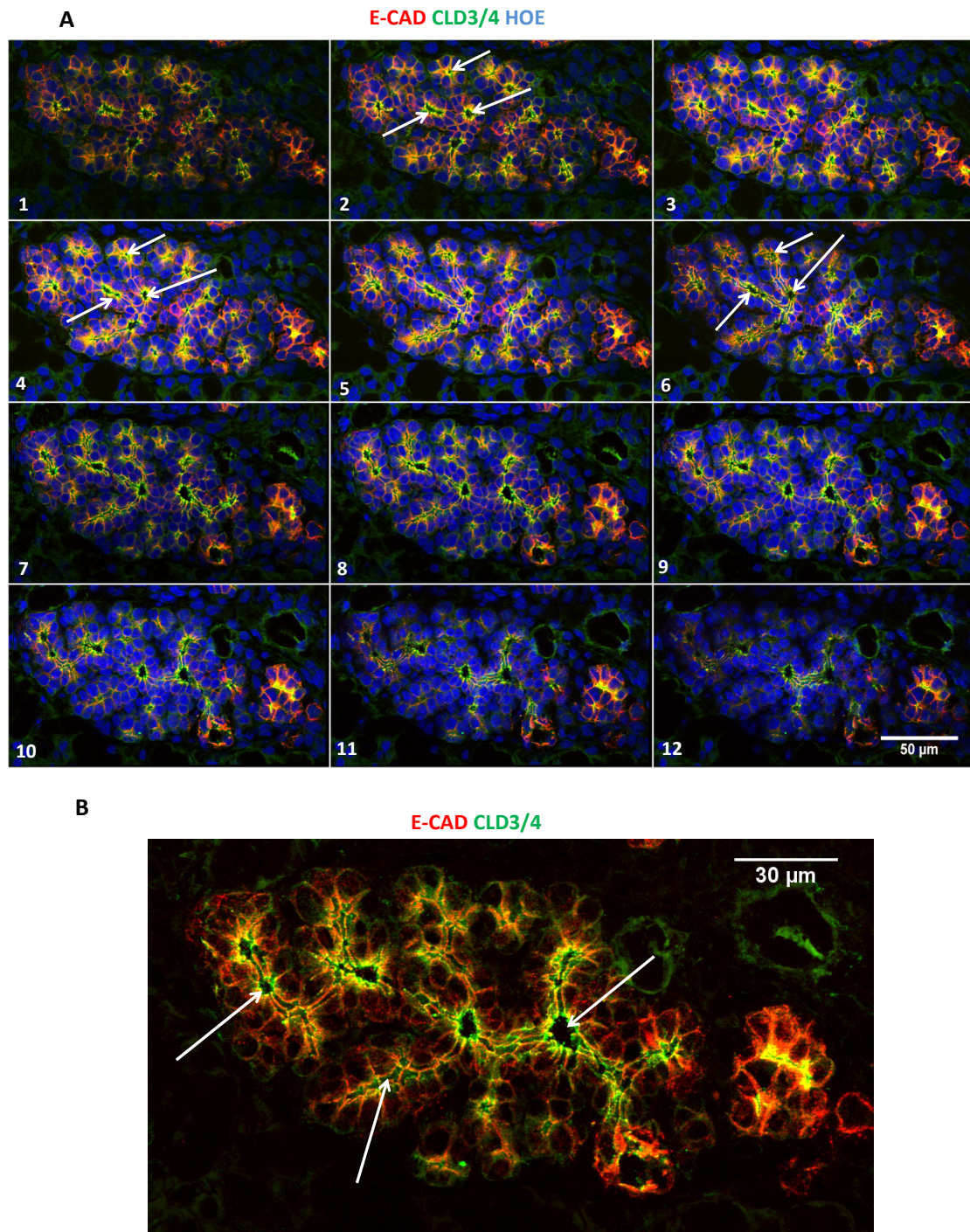


Figura 11. Detalle de estructuras de aspecto “acinar” presentes en el timo Nude adulto. A. Crio-secciones de 10 μm procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul), escaneadas en el eje z con una separación de 0,1 μm entre secciones con objetivo HCX PL APO lbd.BL 63.0x1.40 OIL. Se muestra un detalle de las zonas de aspecto acinar de un timo Nude. Los números indican el orden de las secciones. **B.** Reconstrucción tridimensional de las imágenes mostradas en A. Se observa un lumen ramificado y continuo (flechas).

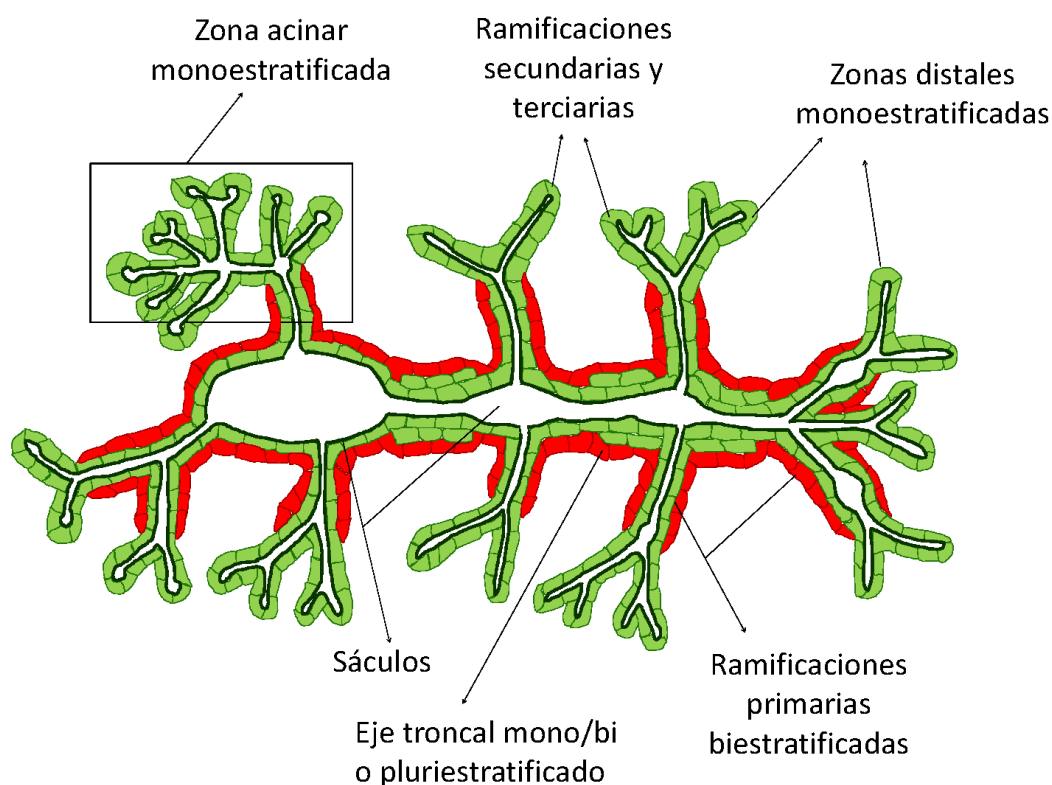


Figura 12. Esquema representativo de la estructura del timo Nude adulto. Se representa en verde la zona Cld3/4+ y en rojo la Cld3/4-. La línea verde oscura indica la polarización de las claudinas 3/4 hacia la membrana luminal. Se observa una estructura epitelial ramificada en torno a un lumen central continuo y ramificado donde se distingue un eje troncal que por regiones define sáculos en cuyas proximidades se observan estructuras de aspecto acinar (flechas).

1.2. El desarrollo del timo Nude implica un proceso de ramificación y formación de lumen.

El desarrollo temprano del timo *Nude* ha sido bien caracterizado previamente (Cordier, 1974) y resulta bastante similar al del timo *wt*. Implica la evaginación de la tercera bolsa faríngea, la formación de una estructura globular constituida por una masa epitelial de donde el primordio tímico se aísla del paratiroideo y migra hacia el mediastino. Sin embargo, su evolución posterior hasta un timo adulto ha sido poco estudiada. En este sentido, hemos analizado la evolución del primordio epitelial tímico desde los 12,5 dpc. hasta el estadio postnatal en que se constituye la estructura tubular ramificada descrita en el apartado anterior.

Mediante inmunomarcaje para queratina 8 (K8) y Cld3/4 de cortes seriados de lóbulos tímicos de edades comprendidas entre los 12,5 y 18,5 dpc. y postnatales (fig.

13), observamos que el esbozo tímico de 12,5 dpc. estaba constituido por una masa epitelial pluriestratificada organizada en torno a un lumen central presumiblemente resultante del lumen primitivo producido por la evaginación del endodermo, similar a la yema inicial que forman otros órganos derivados de la misma hoja embrionaria. En este esbozo diferenciábamos la capa luminal, una capa basal y una masa intermedia de aspecto despolarizado. Un día más tarde, a los 13,5 dpc., en esta masa celular intermedia aumentaba la expresión de Cld3/4 en la región próxima al lumen primario pero no en la zona más externa. Entre los 14,5 y los 15,5 dpc. se reorganizaba aparentemente el epitelio, lo que implicaba el inicio de su lobulación externa y la reorientación de las capas internas en torno a las zonas de mayor expresión de Cld3/4. Entre 16,5 y 17,5 dpc., este patrón se hacía más obvio; por una parte, las cada vez más evidentes lobulaciones, iban elongándose progresivamente, mientras que, en el interior, se regulaba positivamente a lo largo de la estructura la expresión de Cld3/4 en toda la zona central. Dentro de esta región Cld3/4⁺ comenzaban a evidenciarse lúmenes en distintas zonas, limitados por células Cld3/4^{hi} con expresión polarizada de la molécula hacia el lumen. A partir de este momento, lo que se producía era una remodelación del epitelio con organización de las uniones estrechas de manera que las zonas centrales Cld3/4⁺ iban polarizando la expresión de Cld3/4 y definiendo un lumen cada vez más evidente y continuo, a medida que el epitelio perdía estratificación y adquiría una forma elongada y ramificada hasta que, finalmente, se resolvía en la estructura postnatal tubular, ramificada, en su mayoría mono o biestratificada (fig. 13). Este proceso era muy similar al proceso de tubulogénesis que se ha descrito previamente como mecanismo de formación del sistema colector del páncreas (Villaseñor y cols., 2010).

Puesto que todo este crecimiento implicaba proliferación celular, analizamos si esta forma de crecimiento ramificado estaba relacionada con proliferación distal de las ramas. Utilizamos el marcador Ki67 para identificar la posición de las células proliferativas en cada uno de los estadios y observamos, como se había descrito en páncreas (Villaseñor y cols., 2010), que la formación de esta estructura ramificada no obedecía a la presencia de extremos de crecimiento, sino que se producía a partir de una proliferación masiva de las células, a lo largo de toda la estructura y afectaba tanto a las células Cld3/4⁻ como a las Cld3/4⁺ (fig. 14 A). Además, esta proliferación no era

uniforme a lo largo de todo el desarrollo sino que era mayor entre los estadios 13,5 y 15,5 dpc. (fig. 14 B). A 18 dpc. y posteriormente, se producía, además de un descenso significativo en la proliferación, un incremento en la proporción de células Cld3/4+ (fig. 14 B). Puesto que las células Cld3/4+ y las Cld3/4- mostraban niveles similares de proliferación hay que concluir que este aumento de la población Cld3/4+ se debía a diferenciación de células Cld3/4- a Cld3/4+ y no a una proliferación diferencial (fig. 14 B). En esta fase final del desarrollo del timo *Nude*, por tanto, predominaba la remodelación del epitelio con la diferenciación de la mayoría de las células Cld3/4- a células Cld3/4+, la polarización apical de las mismas, su incorporación a la pared del lumen y la consiguiente desestratificación.

Estos resultados implicaban que al igual que se ha descrito durante el desarrollo del páncreas (*Villaseñor y cols., 2010*), el desarrollo del timo *Nude* implicaba procesos de proliferación, despolarización-polarización y estratificación-desestratificación que conllevan la remodelación del epitelio a partir de una masa epitelial estratificada que crece desestratificándose, elongándose y ramificándose, a la vez que define un lumen central continuo.

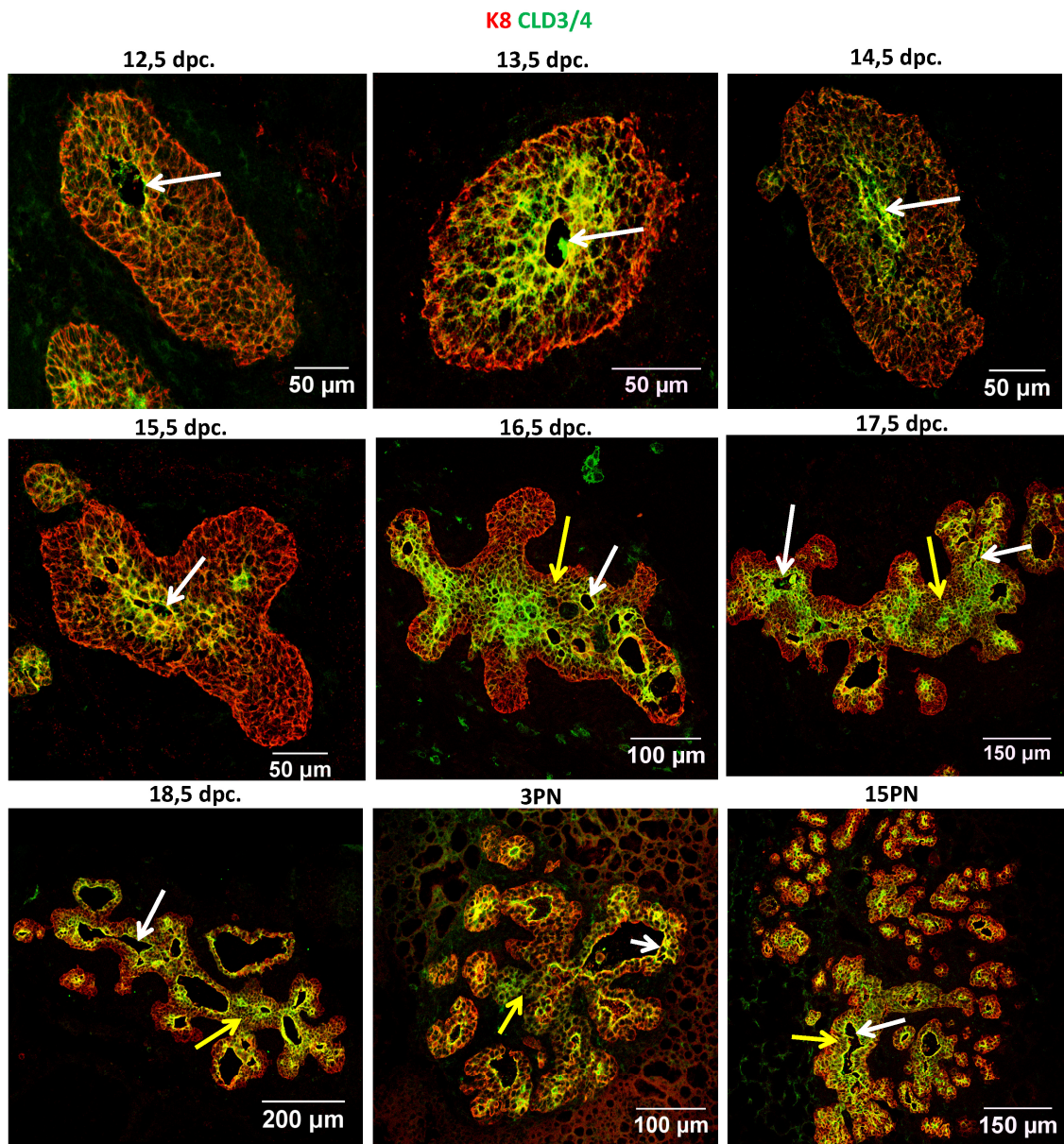
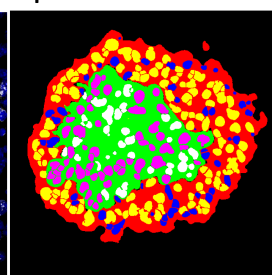
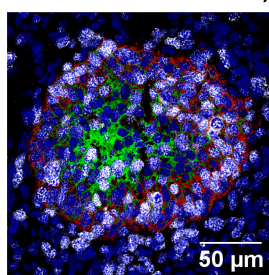


Figura 13. El timo Nude crece como una masa epitelial con formación de lumen de novo y desestratificación en torno a un lumen en formación a la vez que se repliega en una estructura ramificada. Criosecciones de 10 μm de timos Nude de distintas edades fetales y postnatales, procesadas para inmunodetección de K8 (rojo) y Cld3/4 (verde). Objetivos HC PL APO CS 10.0x0.40 UV (18,5 dpc.) y HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM (el resto). Se observa que, a lo largo de la ontogenia, el epitelio sufre un proceso de crecimiento formando primero una masa epitelial en torno al lumen primario/primitivo (12.5-13.5 dpc.). En esta masa epitelial estratificada que sigue creciendo y comienza a lobular se produce una regulación positiva de la expresión de Cld3/4 en la parte central y la formación de novo en ella de diferentes lúmenes (flechas blancas) (14.5-18.5 dpc.). A medida que se avanza en el desarrollo las células Cld3/4+ se incorporan a la pared del lumen creciente, se produce con ello la desestratificación del epitelio en torno a él a la vez que el epitelio se repliega, ramifica y elonga. Las flechas amarillas señalan capas intermedias en torno al lumen en proceso de organización con un marcaje de Cld3/4 no polarizado (Cld3/4^{lo}).

A

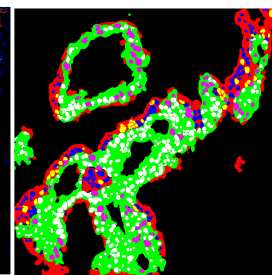
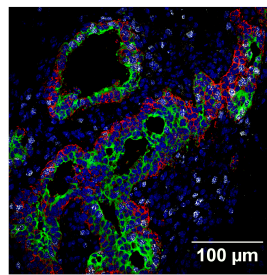
E-CAD CLD3/4 KI67 HOE

13,5 dpc.

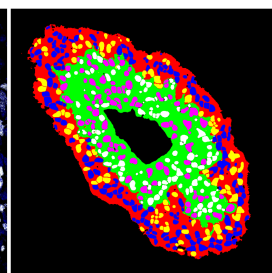
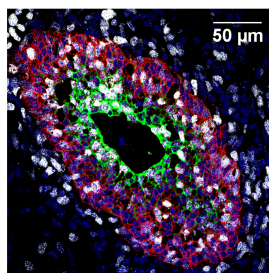


E-CAD CLD3/4 KI67 HOE

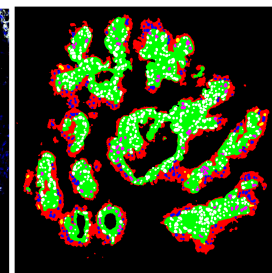
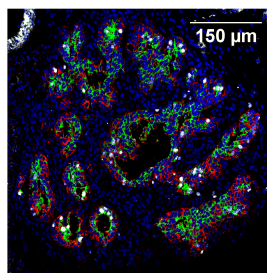
18,5 dpc.



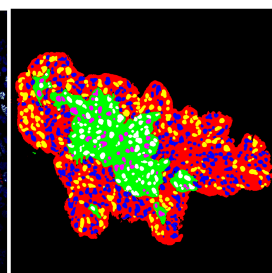
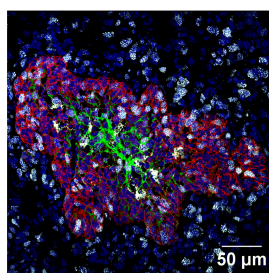
14,5 dpc.



3PN



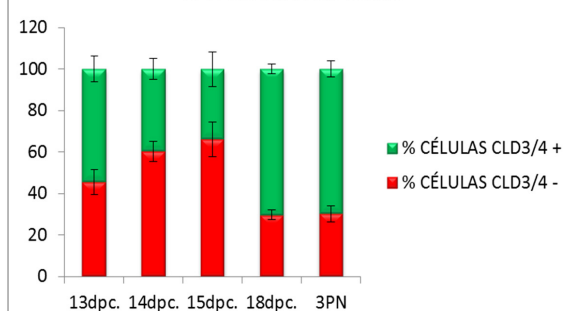
15,5 dpc.



- Zona CLD3/4-
- Zona CLD3/4+
- Núcleos no proliferativos zona CLD3/4-
- Núcleos proliferativos zona CLD3/4-
- Núcleos no proliferativos zona CLD3/4+
- Núcleos proliferativos zona CLD3/4+

B

% CÉLULAS POR ZONAS



% CÉLULAS PROLIFERATIVAS POR ZONAS

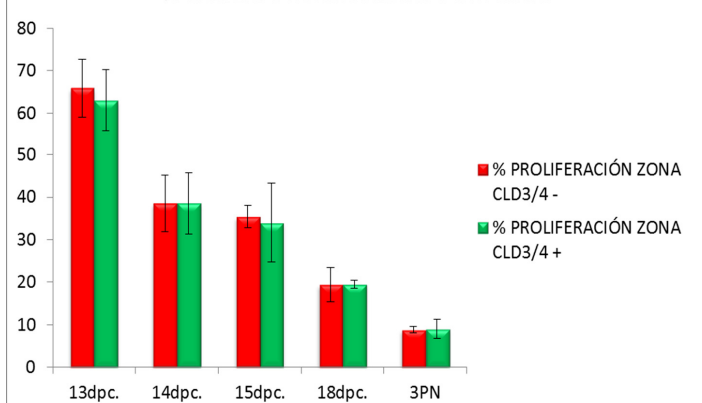


Figura 14. Proliferación del epitelio *Nude* en distintos estadios del desarrollo tímico. **A.** La primera y la tercera columna muestran criosecciones de 10 μm de timos *Nude* de distintas edades fetales y postnatales, procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde), Ki67 (blanco) y Hoechst (azul). Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Las columnas segunda y cuarta muestran una segmentación de dichas imágenes, donde se representa la zona Cld3/4- (rojo), la Cld3/4+ (verde), los núcleos no proliferativos y proliferativos de la zona Cld3/4- (azul y amarillo, respectivamente) y los núcleos proliferativos y no proliferativos de la zona Cld3/4+ (blanco y magenta, respectivamente). Se observa que entre 13,5 y 15,5 dpc. hay un mayor número de células proliferando que a partir de 18,5 dpc., pero lo hacen indistintamente en las zonas Cld3/4+ y las Cld3/4-, así como un aumento de la zona Cld3/4+ desde 18,5 dpc. en adelante. **B.** Representación gráfica de las imágenes anteriores. Los datos son la media y var/devest de 15 secciones procedentes de 3 individuos. Observamos que entre 15 y 18 dpc. hay un aumento de células Cld3/4+ que no corresponde con una mayor proliferación de las mismas; por el contrario el porcentaje de células en proliferación descende gradualmente desde 13 dpc. en adelante tanto en células Cld3/4+ como en las Cld3/4-.

1.3. Cinética del desarrollo del timo *Nude*: ramificación, estratificación-desestratificación y formación de lumen.

Analizamos en mayor detalle el proceso de formación de la estructura del timo *Nude* mediante un estudio tridimensional, tras inmunomarlo para E-cadherina y Cld3/4, de varios estadios bien mediante inmunomarcaje “in toto” o reconstrucción de cortes seriados a lo largo de todo el órgano.

Observamos que a 13,5 dpc., el esbozo tímico constituía una masa más o menos fusiforme (fig. 15) en la que distinguíamos el lumen inicial alrededor del cual se disponía una masa estratificada de células epiteliales en la que la expresión de Cld3/4 identificaba una región próxima al lumen (fig. 16 A-C). En esta zona, las células mostraban un marcaje de Cld3/4 no polarizado, y, a veces, dejaban pequeños huecos entre ellas (fig. 16 A-C).

A los 15,5 dpc. la masa epitelial, a la vez que aumentaba de tamaño, empezaba a mostrar forma irregular con protuberancias que anticipaban la futura ramificación (fig. 17). Independientemente de su forma, esta masa epitelial estaba constituida por una capa externa organizada y una masa central estratificada y aparentemente más desorganizada que la externa, en la que se apreciaba una zona central continua de células Cld3/4+ que en algunas regiones presentaban marcaje intenso y polarizado (Cld3/4^{hi}) definiendo lúmenes incipientes, microlúmenes y rosetas que definían focos de polarización sin contacto evidente con los anteriores y alineamientos de superficies

celulares en los que se producía polarización de moléculas apicales, denominados canales o trazados de polarización (fig. 18 A-C) (ver fig. 22 B).

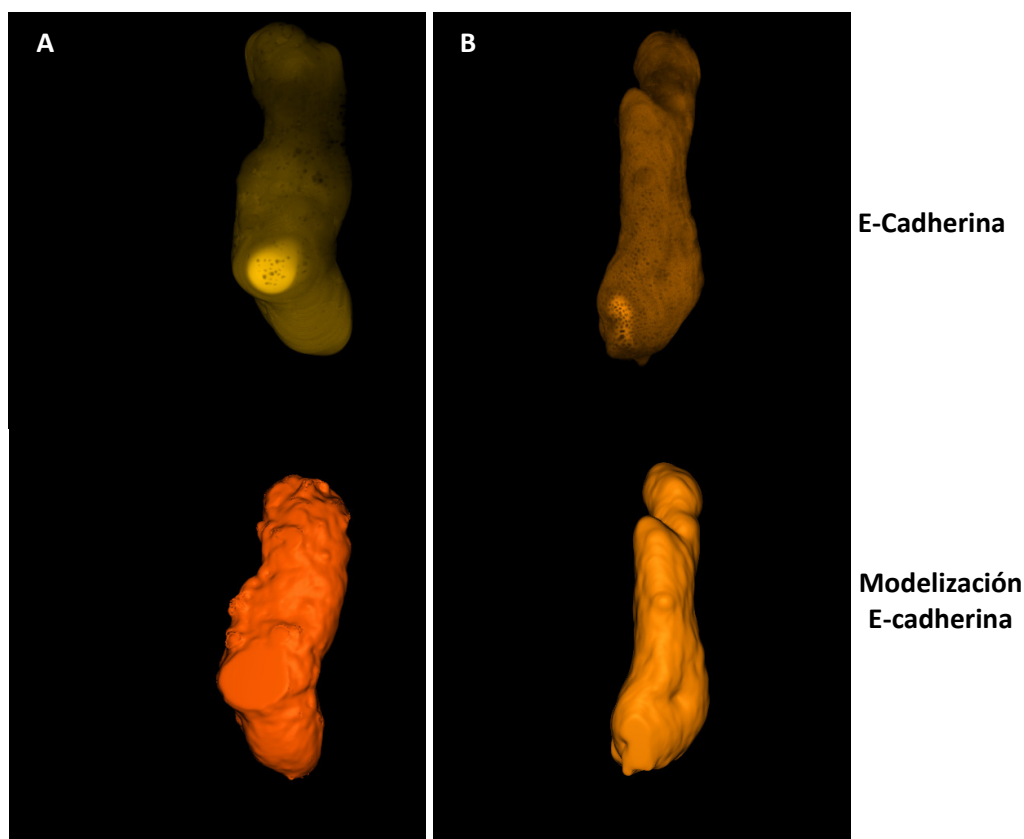


Figura 15. Reconstrucciones tridimensionales de timos Nude de 13,5 dpc. Las imágenes muestran reconstrucciones tridimensionales, volumen (superior) y superficie (inferior), de la estructura externa de dos lóbulos tímicos tempranos Nude (A y B), obtenidos por procesamiento de los mismos para inmunodetección “in toto” de E-cadherina en el órgano entero. Las series Z a partir de las cuales se hicieron las reconstrucciones se obtuvieron por microscopía confocal con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 0,6 μm entre cada plano. Se observa que el lóbulo tímico en este estadio fetal temprano es una estructura fusiforme con lobulación incipiente.

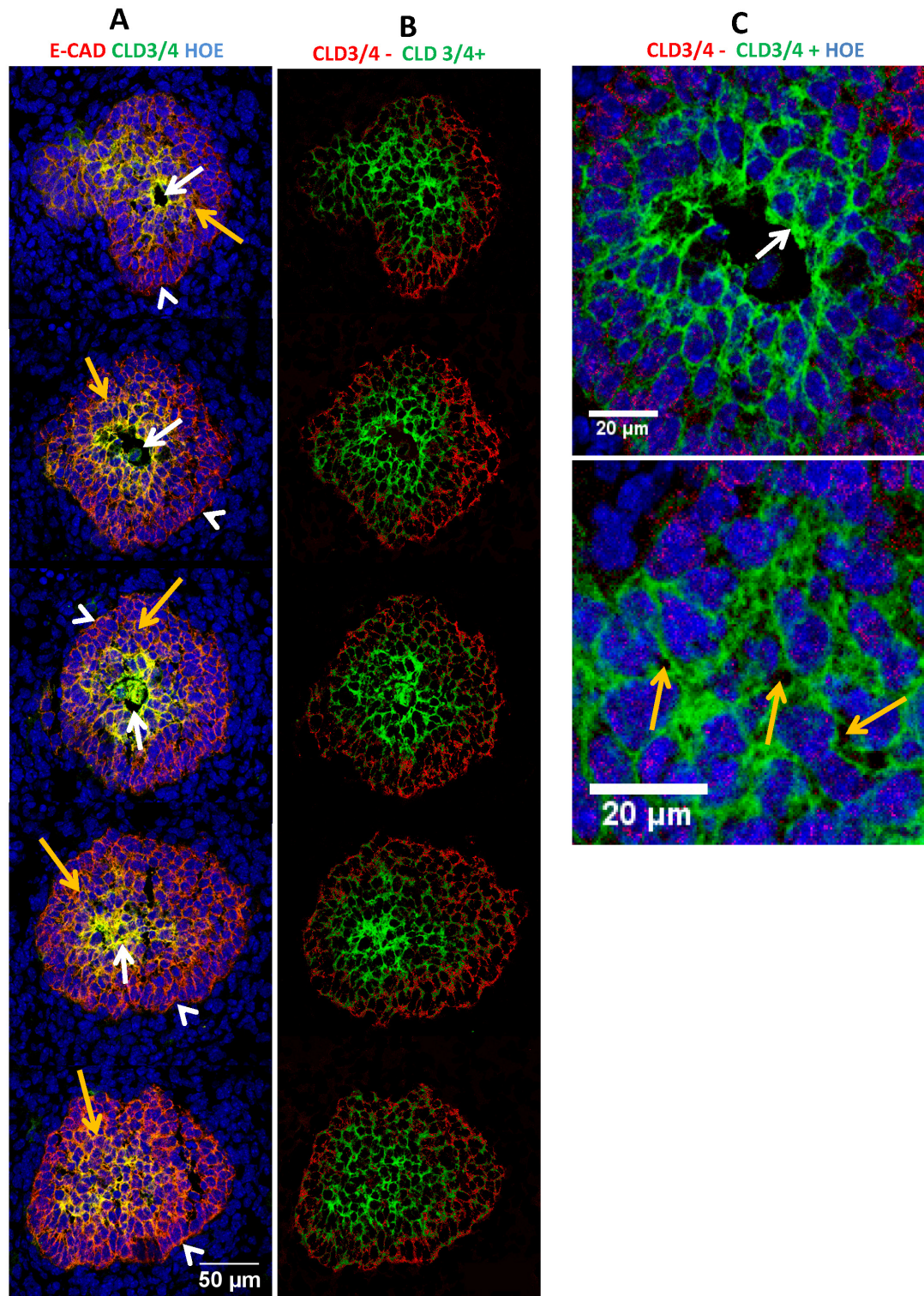


Figura 16. El timo Nude de 13,5 dpc. es una estructura epitelial pluriestratificada con un lumen central.

A. Criosecciones seriadas de 10 µm procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Se observa una zona periférica donde las células epiteliales están organizadas en capas (cabezas de flechas) y una zona más central, donde se observa el lumen central (flechas blancas), rodeado de una región Cld3/4+ en la que este marcaje tiene un aspecto reticular no polarizado (flechas amarillas). **B.** Mapas de píxeles que muestran las poblaciones Cld3/4+ y Cld3/4-, donde se observa que el marcaje de Cld3/4 no está restringido al lumen, sino que se extiende en la región que lo rodea, a excepción de la zona más periférica. **C.** Detalles de las criosecciones

anteriores donde se observa un marcaje polarizado de Cld3/4 en torno al lumen (flecha blanca) y una región con un marcaje de aspecto reticular no polarizado de Cld3/4 donde las células dejan espacios intercelulares (flechas amarillas).

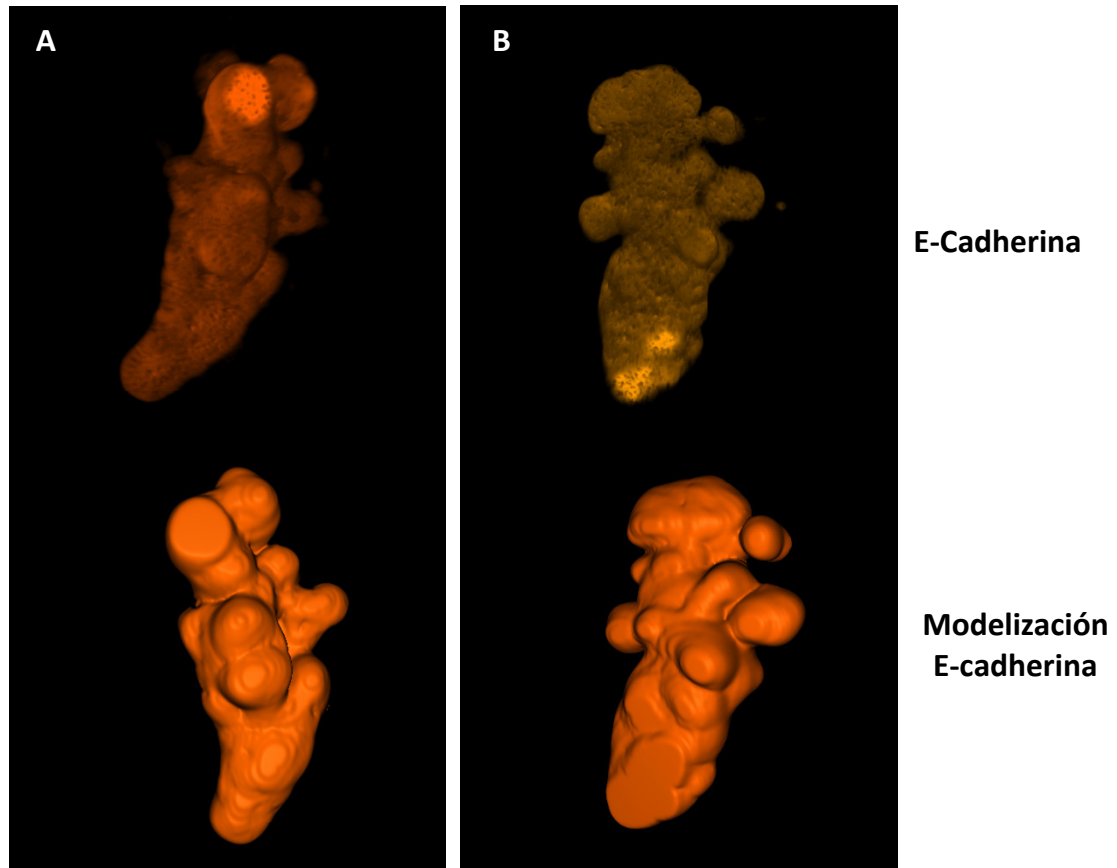


Figura 17. Estructura lobulada del timo Nude de 15,5 dpc. a partir de un eje central. Las imágenes muestran reconstrucciones tridimensionales, volumen (superior) y superficie (inferior), de la estructura externa de dos lóbulos tímicos Nude de 15,5 dpc. (A y B) procesados para inmunodetección in toto de E-cadherina. Las series Z a partir de las cuales se hicieron las reconstrucciones se obtuvieron con un objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV con una separación de 1 μm entre cada sección. Se observa una estructura tridimensional con un eje central del que parten algunas lobulaciones.

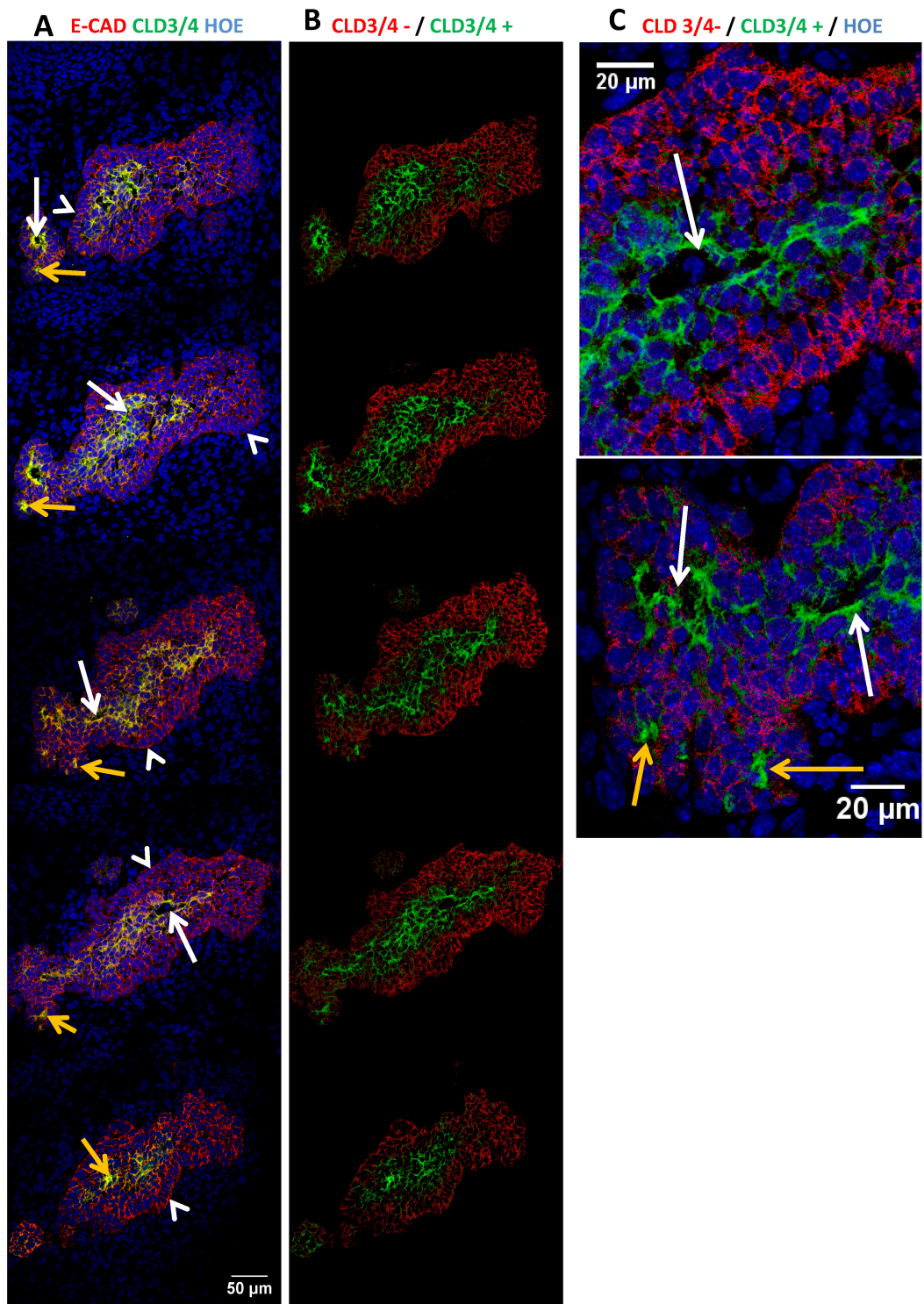


Figura 18. El timo Nude de 15,5 dpc. es una estructura epitelial en cuya zona central Cld3/4+ se observa la formación de nuevos lúmenes y focos de polarización. **A.** Criosecciones seriadas de 10 µm procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Se observa una región central Cld3/4+ en la que la expresión de estas proteínas, en general, no está polarizada. En algunos puntos sí se observa polarización de las mismas en torno a lúmenes o dando lugar a canales de polarización (flechas blancas) y focos de polarización en la parte central de rosetas (flechas amarillas). Las cabezas de flechas indican capas externas Cld3/4- organizadas. **B.** Mapas de píxeles que muestran la población Cld3/4+ (verde) y Cld3/4- (roja), donde se observa que el marcaje de Cld3/4 se extiende por la región central, aunque la proporción de células

Cld3/4+ es menor que a 13,5 dpc. C. Detalles de las criosecciones anteriores, donde se observa el lumen delimitado por un marcaje polarizado de Cld3/4 (superior, flecha blanca) y una zona donde en algunos puntos las Cld3/4 polarizan formando focos (inferior, flechas amarillas) y canales de polarización (inferior, flechas blancas).

A los 18,5 dpc. la estructura epitelial que conformaba el timo *Nude* había crecido considerablemente en longitud apareciendo alargada, plegada y con múltiples ramificaciones, algunas incipientes y otras ya más desarrolladas (fig. 19 A). La expresión de Cld3/4 mantenía una estructura continua y ramificada a lo largo de todo el lóbulo tanto en la región más troncal como en sus ramificaciones. En esta estructura, el marcaje Cld3/4^{hi} definía en numerosos puntos lúmenes que conectaban entre sí mediante cordones de células Cld3/4^{hi} que se alineaban y polarizaban la expresión de Cld3/4 en la zona central donde diferenciará la membrana apical, definiendo trazados o canales de polarización (ver fig. 22 B). En el caso de las ramificaciones surgían también lúmenes secundarios o distales que conectaban con el lumen principal a través de estos canales. Esta red ramificada de lúmenes y canales de polarización no era aún del todo continua a lo largo de toda la estructura Cld3/4+ que sí lo era (fig. 19 B, C). En las diferentes secciones del lóbulo tímico de esta edad, se observaba un importante grado de polarización y organización del nuevo lumen que estaba rodeado por células Cld3/4+ no polarizadas (fig. 20).

En este estadio ya comenzábamos a observar una cierta desestratificación o adelgazamiento de la masa intermedia que presentaba menos capas celulares, lo que implicaba que a medida que las células Cld3/4+ proliferaban y/o diferenciaban a partir de las Cld3/4-, se producía la polarización de las mismas y su incorporación al lumen dando lugar a una estructura más delgada y más elongada que va ramificando. Sin embargo, aún se distinguía una región interna Cld3/4+ y otra externa Cld3/4- (E-Cad+ Cld3/4-), por lo que necesariamente la población de células Cld3/4+ ha tenido que ir incrementando de forma paralela a la población Cld3/4- (fig. 20), como indicaban los datos de proliferación antes mostrados. Un análisis a mayor detalle y resolución en las tres dimensiones realizado mediante microscopía confocal de secciones gruesas de lóbulos tímicos de 18,5 dpc. confirmaba este carácter multifocal de lúmenes conectados mediante canales de polarización (ver fig. 22 B) del lóbulo tímico de esta edad (fig. 21).

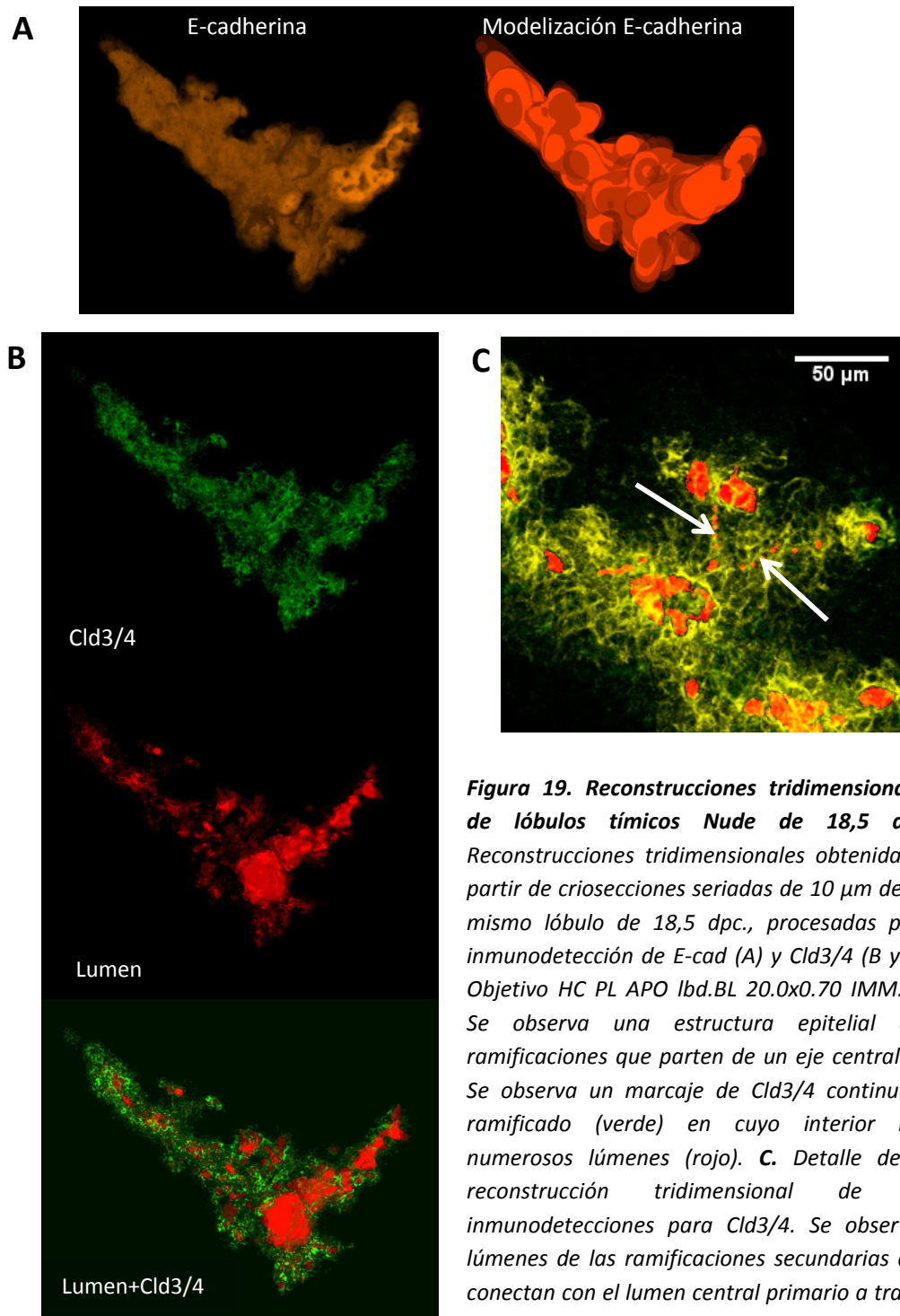


Figura 19. Reconstrucciones tridimensionales de lóbulos tímicos Nude de 18,5 dpc. Reconstrucciones tridimensionales obtenidas a partir de criosecciones seriadas de 10 μm de un mismo lóbulo de 18,5 dpc., procesadas para inmunodetección de E-cad (A) y Cld3/4 (B y C). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **A.** Se observa una estructura epitelial con ramificaciones que parten de un eje central. **B.** Se observa un marcaje de Cld3/4 continuo y ramificado (verde) en cuyo interior hay numerosos lúmenes (rojo). **C.** Detalle de la reconstrucción tridimensional de las inmunodetecciones para Cld3/4. Se observan lúmenes de las ramificaciones secundarias que conectan con el lumen central primario a través de canales de polarización y microlúmenes (flechas).

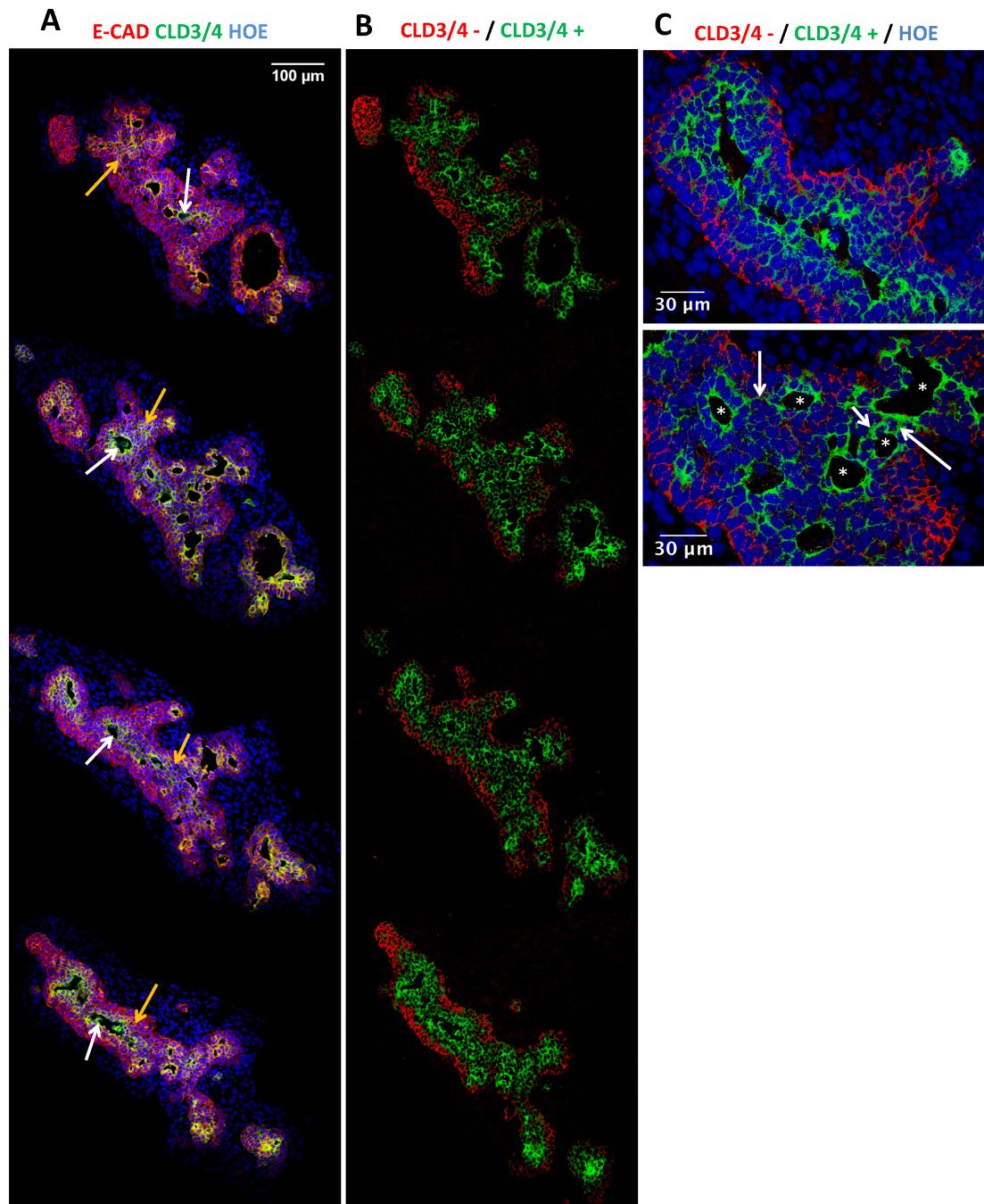


Figura 20. Al final del desarrollo fetal (18,5 dpc.) el timo *Nude* es una estructura epitelial ramificada con múltiples lúmenes en la región central *Cld3/4+*. **A.** Inmunodetección de E-cad (rojo), *Cld3/4* (verde) y Hoechst (azul) sobre criosecciones. Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. **B.** Mapas de píxeles de las criosecciones anteriores que muestran la población *Cld3/4+* (verde) y *Cld3/4-* (roja), donde se observa que el marcaje de *Cld3/4* continuo y ramificado (flechas amarillas) evidencia múltiples lúmenes (flechas blancas) y constituye casi la totalidad del timo, a excepción de las capas celulares más externas. **C.** Detalle de criosecciones procesadas del mismo modo que en la figura A. Proyecciones de máxima intensidad de criosecciones escaneadas en el eje Z con objetivo HCX PL APO Ibd.BL 63.0x1.40 OIL con una separación de 0,2 μm entre cada sección. Se observa que los lúmenes (asteriscos) o están conectados entre sí por un entramado de células *Cld3/4+* (inferior, flechas blancas), o son ya claramente continuos a esta edad (superior).

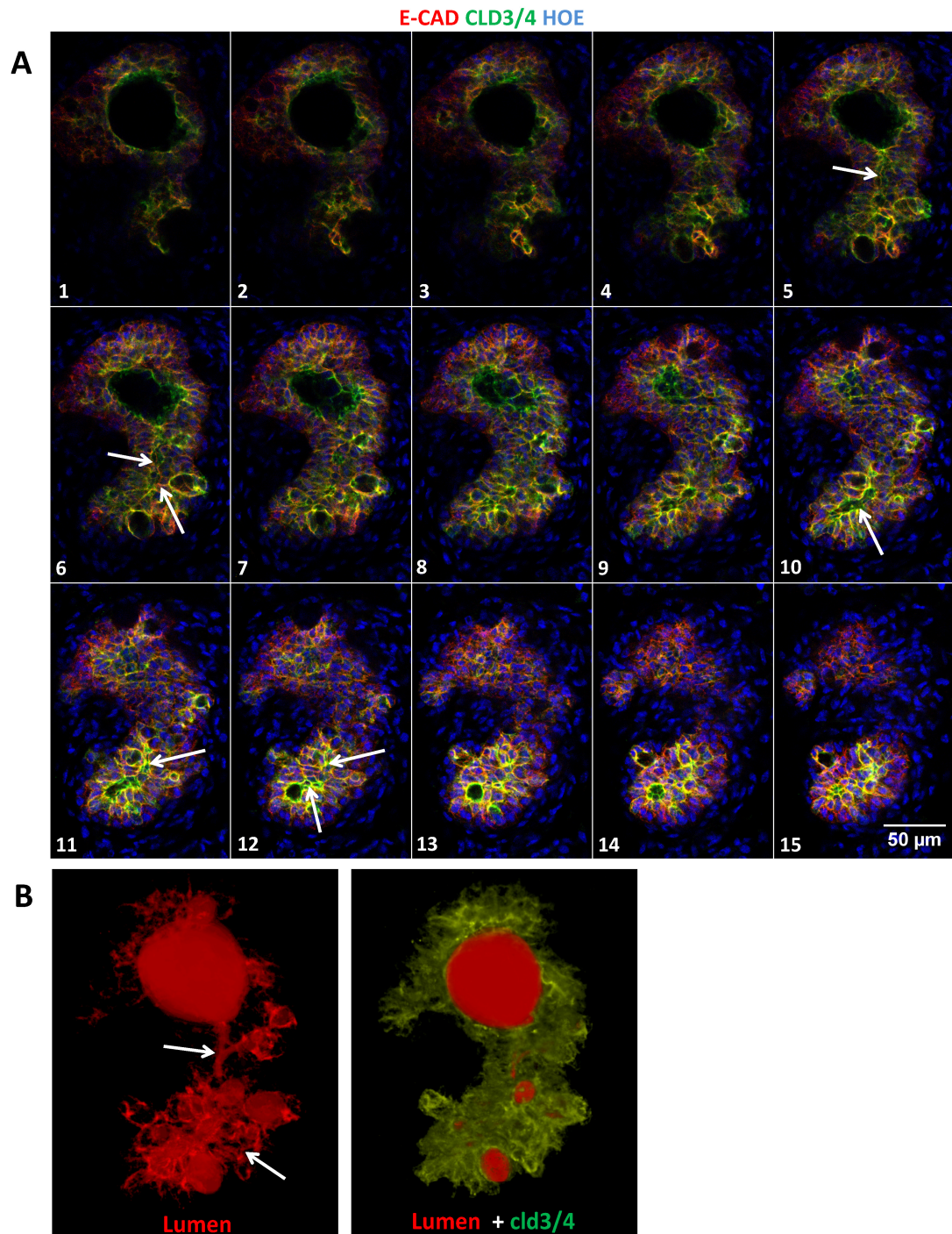


Figura 21. Los lúmenes de lóbulos tímicos de 18,5 dpc. coalescen entre sí en muchos casos, pero no en todos. A. La serie muestra imágenes obtenidas a partir del escaneo en el eje Z con un objetivo de HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM de criosecciones de 120 µm de lóbulos tímicos de 18,5 dpc., con una separación de 0,5 µm entre planos. La criosección fue procesada para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). **B.** Reconstrucción tridimensional del marcaje de Cld3/4 de la serie anterior. Se observa que los lúmenes están conectados entre sí mediante canales de polarización (rojo), formados por alineamiento de células Cld3/4+ (verde), polarización de Cld3/4 y formación de canales y microlúmenes (flechas blancas A y B).

La cinética de formación del lumen implicaba, por tanto, la diferenciación a célula apical de las células de la parte central de la masa epitelial y, posteriormente, de las ramificaciones de la misma que conllevaba la expresión de Cld3/4 inicialmente de forma despolarizada, la polarización multifocal de estas células en diferentes puntos a lo largo de la zona central diferenciada y la diferenciación de membranas apicales con la consiguiente formación de lúmenes ciegos y canales de polarización que iban conectando progresivamente hasta, finalmente, producirse la coalescencia de todos ellos en un único lumen (fig. 22 A). El crecimiento del lóbulo y su ramificación hasta la estructura postnatal implicaba la pérdida completa o casi completa de capas de células epiteliales debido a su diferenciación apical y la formación de lumen a partir de las capas intermedias que se incorporaban al lumen creciente. A la vez esto implicaba el elongamiento y plegamiento en una estructura ramificada como también sugerían los datos de proliferación. Todo ello implicaba un proceso de tubulogénesis que, como en otros tejidos epiteliales (*Hogan y Kolodziej, 2002; Villaseñor y cols., 2010*), se producía mediante diferenciación apical y remodelación del epitelio durante su desarrollo (fig. 22 A, B).

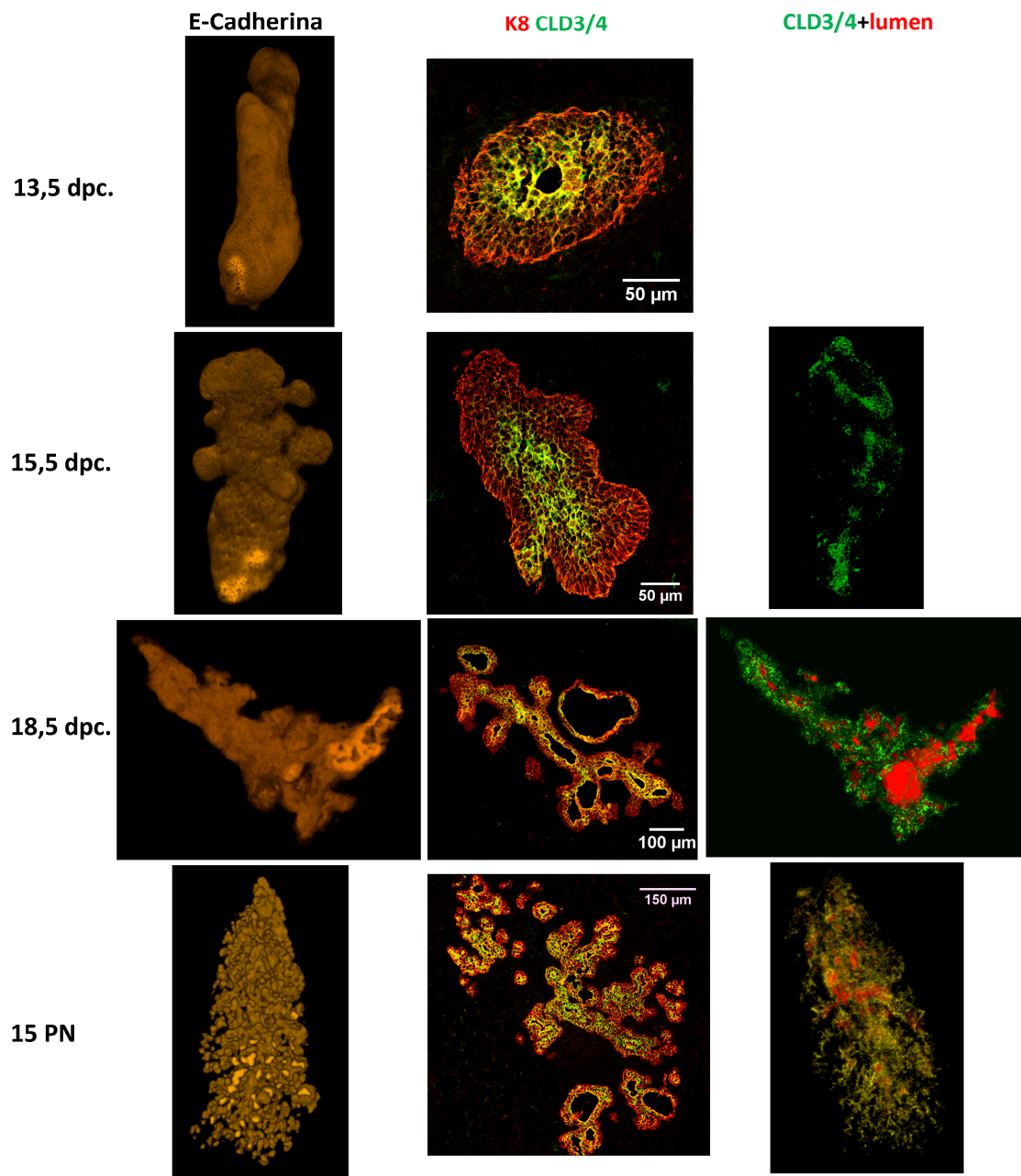


Figura 22 A

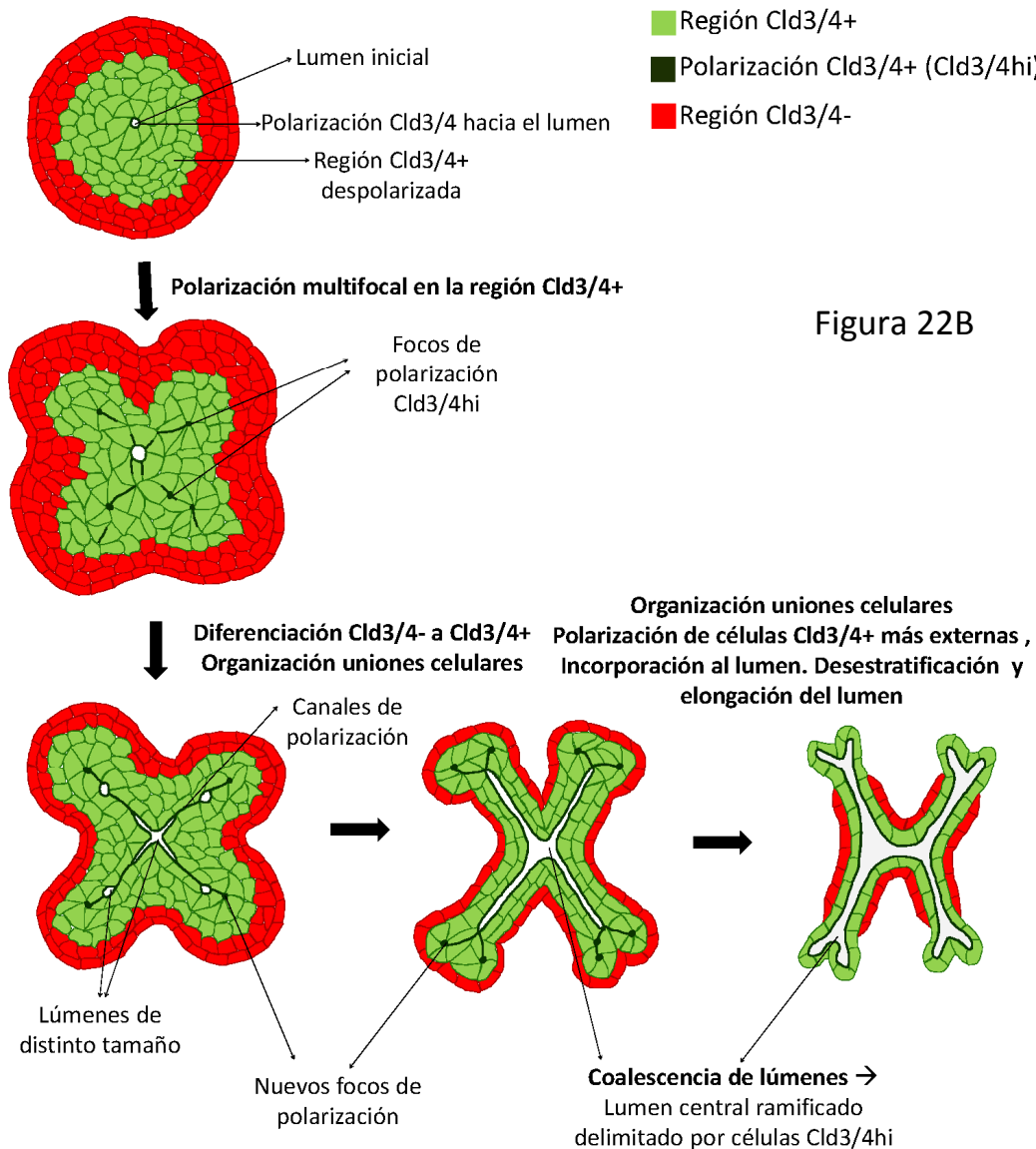


Figura 22B

Figura 22. Resumen del desarrollo del timo Nude desde los estadios fetales tempranos hasta el estadio adulto. A. La evolución durante el desarrollo fetal del timo Nude implica un adelgazamiento y ramificación de la estructura epitelial en torno a un lumen en formación, que por coalescencia de focos luminales termina formando un lumen continuo y ramificado central con pocas capas epiteliales adyacentes en timos adultos. B. **Esquema de la cinética de formación del lumen en timos Nude.** En la masa epitelial pluriestratificada primitiva se observa el lumen inicial delimitado por células con la expresión de Cld3/4 polarizada y una región intermedia en la que las células expresan Cld3/4 de forma despolarizada. Estas células se van organizando y polarizan la expresión de Cld3/4 de forma multifocal. A medida que avanza el desarrollo las células se van alineando y organizando las uniones, de manera que se forman lúmenes de distinto tamaño delimitados por células con las Cld3/4 polarizadas hacia la membrana apical, conectados mediante canales de polarización. Simultáneamente, las células de la región intermedia regulan positivamente la expresión de Cld3/4 y van polarizando e incorporándose a este sistema de focos de polarización y lúmenes. Estas células polarizadas Cld3/4^{hi} definen un lumen cada vez más evidente y continuo formado por la coalescencia de focos luminales, formándose finalmente un lumen continuo y ramificado a medida que el órgano ramifica y desestratifica en torno al mismo mediante este mecanismo de diferenciación apical.

Como se ha descrito en el apartado anterior, según nuestros resultados, la expresión de Cld3/4 en el caso del timo *Nude*, como en el resto de epitelios, está asociada con la diferenciación apical de las células epiteliales y con su función de sellado celular. Sin embargo, en el timo *wt* embrionario Cld3/4 es el primer marcador conocido de células comprometidas con el linaje medular (*Hamazaki y cols., 2007*). Su expresión temprana en el timo *Nude*, similar a la que ocurre en el timo *wt*, se ha asociado con un compromiso medular temprano que tendría lugar en ausencia de FoxN1 (*Nowell y cols., 2011*). Como se ha indicado en la *Introducción* de este trabajo, resultados previos de nuestro grupo indicaban que la diferenciación corteza/médula en el timo *wt* sucedía concomitante o subsiguientemente a una diferenciación epitelial puramente estructural asociada con la expresión de Cld3/4 y la formación de lumen (*Muñoz y cols., 2014*). Por otro lado, está descrito que los timos *Nude* no expresan ningún marcador funcional de epitelio tímico (*Shakib y cols., 2009; Nowell y cols., 2011; Ripen y cols., 2011*). Por consiguiente, analizamos en estos timos la expresión de marcadores epiteliales asociados con la diferenciación corteza/médula pero que no tienen implicación funcional o, al menos, no se sabe que la tengan, con la idea de identificar patrones de diferenciación epitelial que pudieran relacionarse con la base estructural de una diferenciación funcional corteza/médula.

Analizamos, en primer lugar, la expresión de las queratinas 5 y 8 (K5 y K8, respectivamente), que en el timo adulto diferencian corteza (K8+K5-) de médula (K8-K5+) y también definen una población K8+K5+ localizada, fundamentalmente, en el borde corticomedular. Por otra parte, se asume que la expresión de estas queratinas, especialmente K5, está asociada con la diferenciación funcional del timo y que la población K5+K8+ está vinculada a poblaciones precursoras bipotentes o progenitores corticales, o con estadios inmaduros o intermedios proliferativos (*Bennett y cols., 2002; Gill y cols., 2002*). Por su parte, el marcador MTS10 está siempre asociado con las células medulares y algunas células de la subcápsula, aunque se desconoce el epítipo que reconoce este anticuerpo. Otro marcador asociado con la diferenciación medular aquí utilizado es la lectina *Ulex Europaeus* (UEA), una C-lectina con especificidad por L-fucosa, que se une a los carbohidratos de la superficie de las mTECs (*Farr y Anderson, 1985*).

La utilización de la expresión de estos marcadores durante el desarrollo del epitelio del timo *Nude* demostró que el proceso de ramificación y formación de lumen que acabamos de describir conllevaba la expresión de todos estos marcadores y que ésta variaba a medida que se producía el tránsito desde una masa epitelial engrosada hasta la estructura tubular típica del timo *Nude* adulto (fig. 23). Mientras K8 se expresaba en todo el epitelio en todos los estadíos fetales y postnatales, MTS10 o K5 se asociaban inicialmente con la diferenciación y formación de lumen delimitado, como hemos descrito, por células polarizadas Cld3/4^{hi} apareciendo, posteriormente, también en las capas o zonas basales de la estructura epitelial estratificada que forma el timo *Nude* postnatal (fig. 23).

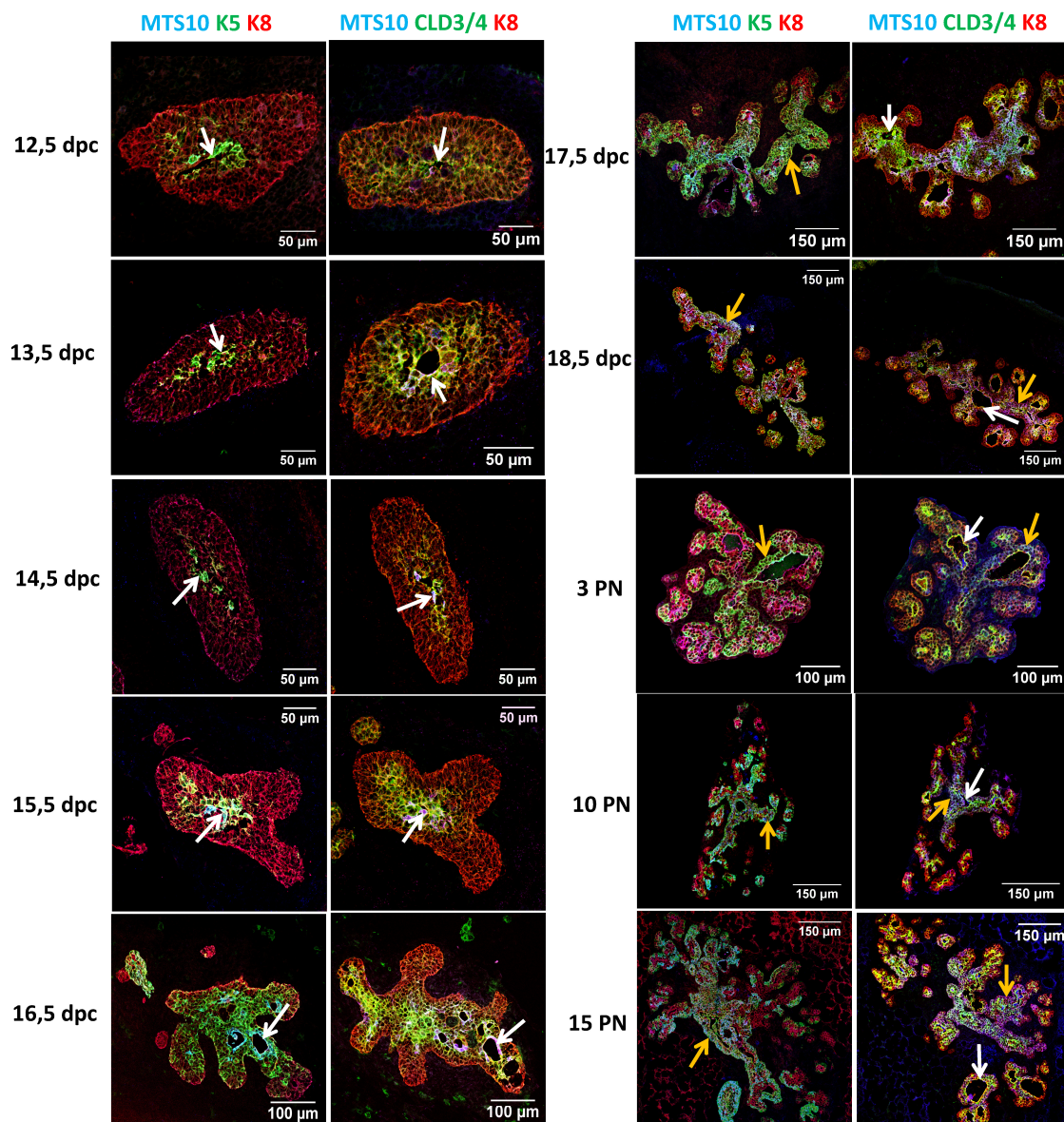


Figura 23. Evolución de marcadores epiteliales tímicos a lo largo del desarrollo fetal y postnatal de ratones *Nude*. Inmunodetección de K8 (rojo), K5 o Cld3/4 (verde) y MTS10 (azul) sobre criosecciones de 10 µm de distintos estadios fetales y postnatales de timos *Nude*. Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa que K8 se expresa por todo el epitelio en todos los estadios. Hasta 16,5 dpc., K5 se expresa en las mismas regiones que Cld3/4, aunque con un patrón más restringido y MTS10 aparece solamente en una subpoblación de células Cld3/4+ y K5+ (flechas blancas) asociada a los lúmenes en formación Cld3/4^{hi} (flechas blancas). A partir de 16,5 dpc. el área K5+ aumenta, se extiende hacia zona basal y queda finalmente restringida a diferentes regiones basales y, en algunos casos, apicales. Igualmente, a medida que las zonas más troncales del timo se organizan en estratos la expresión de MTS10 aparece en disposición tanto apical (flechas blancas) como basal (flechas amarillas).

Analizamos en detalle cada uno de los estadios del desarrollo del timo *Nude*. Observamos que a los 13,5 dpc., todo el primordio epitelial tímico era K8+ (fig. 24 A1,

A2). Aunque no se pudieron realizar tinciones simultáneas de K5 y Cld3/4, debido a que los anticuerpos anti-K5 y anti-Cld3/anti-Cld4 están generados en la misma especie (conejo), en cortes seriados se observaba que K5 se expresaba en las células que delimitaban el lumen primario (fig. 24 A1), coincidiendo en gran medida con la tinción de Cld3/4 (fig. 24 A2) aunque con un marcaje algo más restringido. Algunas de estas células en contacto con el lumen primario expresaban ya a esta edad el marcador MTS10 (fig. 24 A-D).

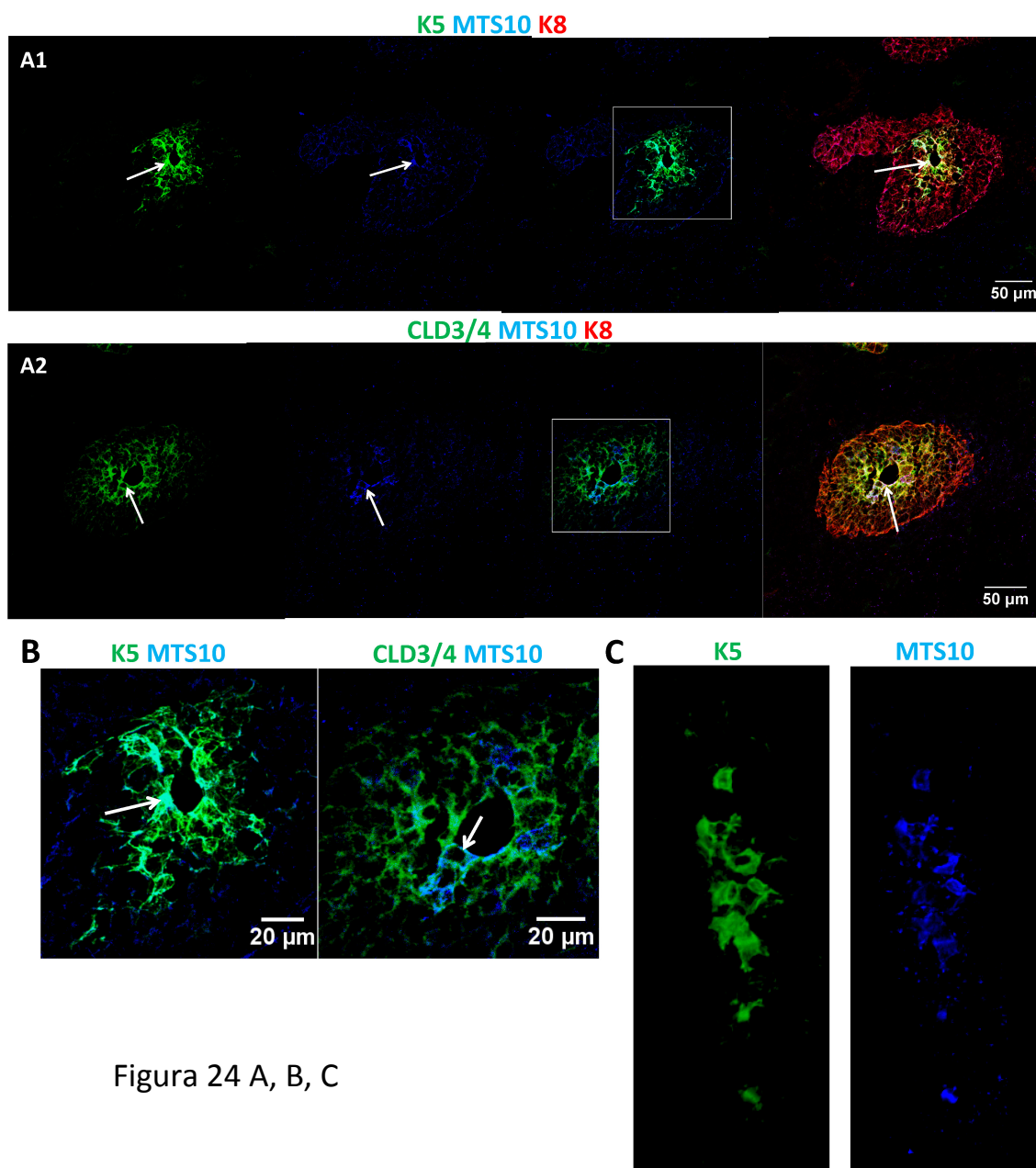


Figura 24 A, B, C

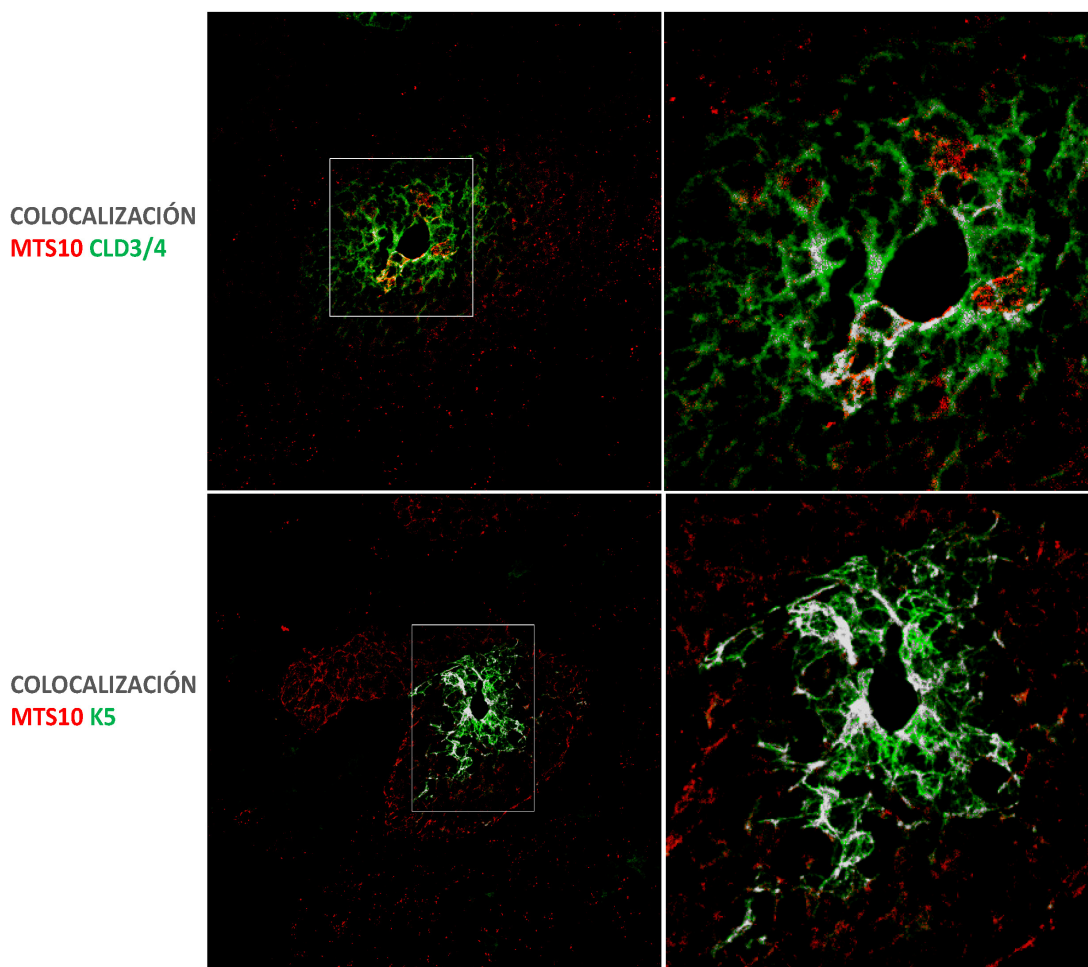


Figura 24 D

Figura 24. En tímicos Nude de 13,5 dpc. K5 y MTS10 se expresan en células asociadas al lumen dentro de la región Cld3/4+. Criosecciones seriadas de 10 μ m de un lóbulo tímico Nude de 13,5 dpc., procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A1), y Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A2). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM; ampliaciones de las zonas enmarcadas se muestran en B. Las flechas señalan células asociadas al lumen central que expresan K5 y MTS10, estando la población MTS10 englobada dentro de la K5+ y ambas dentro de la Cld3/4+. C. Inmunodetección "in toto" de K5 (verde) y MTS10 (azul) sobre lóbulos tímicos Nude de 13,5 dpc. Serie Z obtenida con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 1 μ m entre secciones. Se observa que ambos marcadores tienen una distribución central y bastante coincidente. D. Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización de la expresión de MTS10 (rojo) con la de Cld3/4 o K5 (verde). MTS10 colocaliza en la capa luminal con las células Cld3/4 y K5 positivas (blanco), definiendo la expresión de Cld3/4 una población algo más extensa que la determinada por K5 y MTS10.

A los 14,5 y 15,5 dpc., el timo *Nude* mantenía este mismo patrón. Las células que polarizaban la expresión de Cld3/4 y se reorganizaban para formar lumen (Cld3/4^{hi}) expresaban K5 y algunas de ellas MTS10, aunque no todas las células Cld3/4+, especialmente aquellas con un marcaje despolarizado más difuso (Cld3/4^{lo}), parecían expresar K5 (figs. 25, 26). A los 15,5 dpc. se observaba ya alguna célula aislada UEA+ asociada al lumen (fig. 26 B).

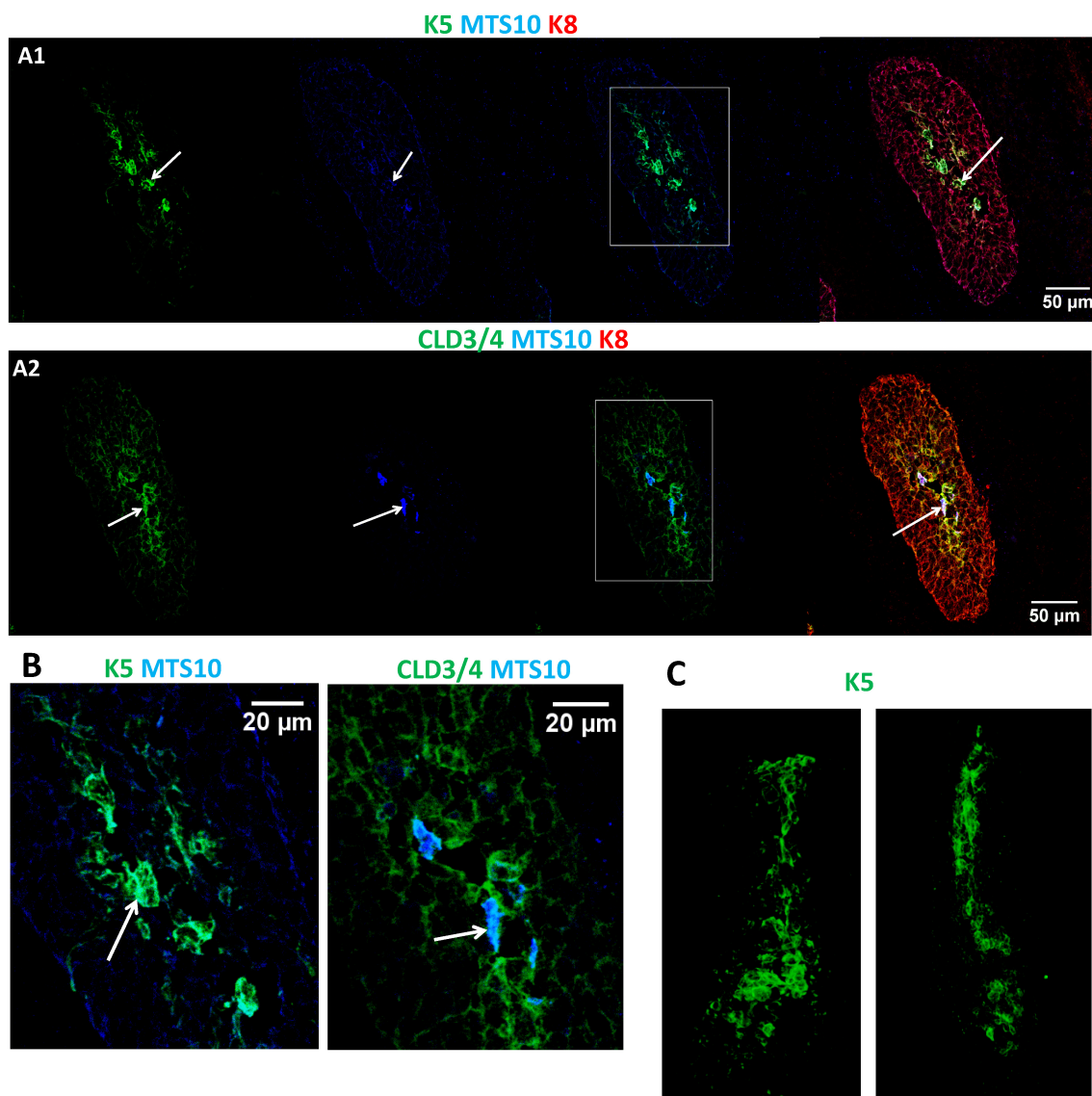


Figura 25 A, B, C

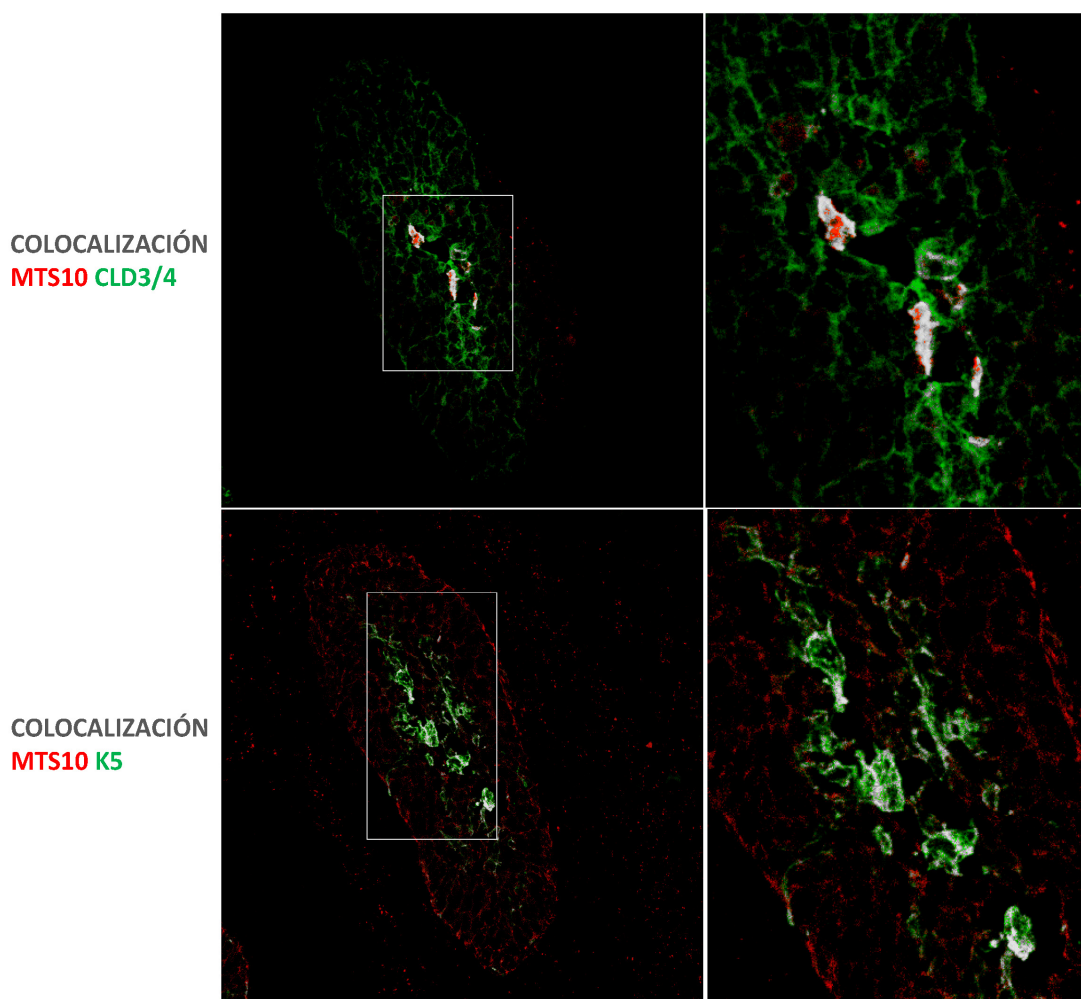


Figura 25 D

Figura 25. En timos *Nude* de 14,5 dpc. K5 y MTS10 se expresan en las células que se reorganizan para formar lúmenes $Cld3/4^{hi}$ dentro de la región $Cld3/4^{+}$. Crio secciones seriadas de 10 μm de un lóbulo tímico *Nude* de 14,5 dpc. procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A1), o $Cld3/4$ (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A2) escaneadas con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM.; B. Ampliaciones de las zonas enmarcadas en A1 y A2. Las flechas señalan células formadoras de lumen $Cld3/4^{hi}$ que coexpresan K5 y MTS10 (A1, A2), estando todo ello englobado dentro de la región más amplia $Cld3/4^{+}$ (B). C. Inmunodetección in toto de K5 (verde) sobre lóbulos tímicos *Nude* de 14,5 dpc. Volumen generado a partir de una serie Z obtenida con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 0,7 μm entre secciones. K5 muestra un marcaje continuo en la zona central del timo. D. Mapas de píxeles donde se muestra la co-expresión (blanco) de MTS10 (rojo) con $Cld3/4$ o K5 (verde). Se observa que la población MTS10+ colocaliza en la zona central con la población $Cld3/4^{+}$, así como con las zonas más centrales de la región K5+, indicando que las células K5+MTS10+ son también $Cld3/4^{+}$.

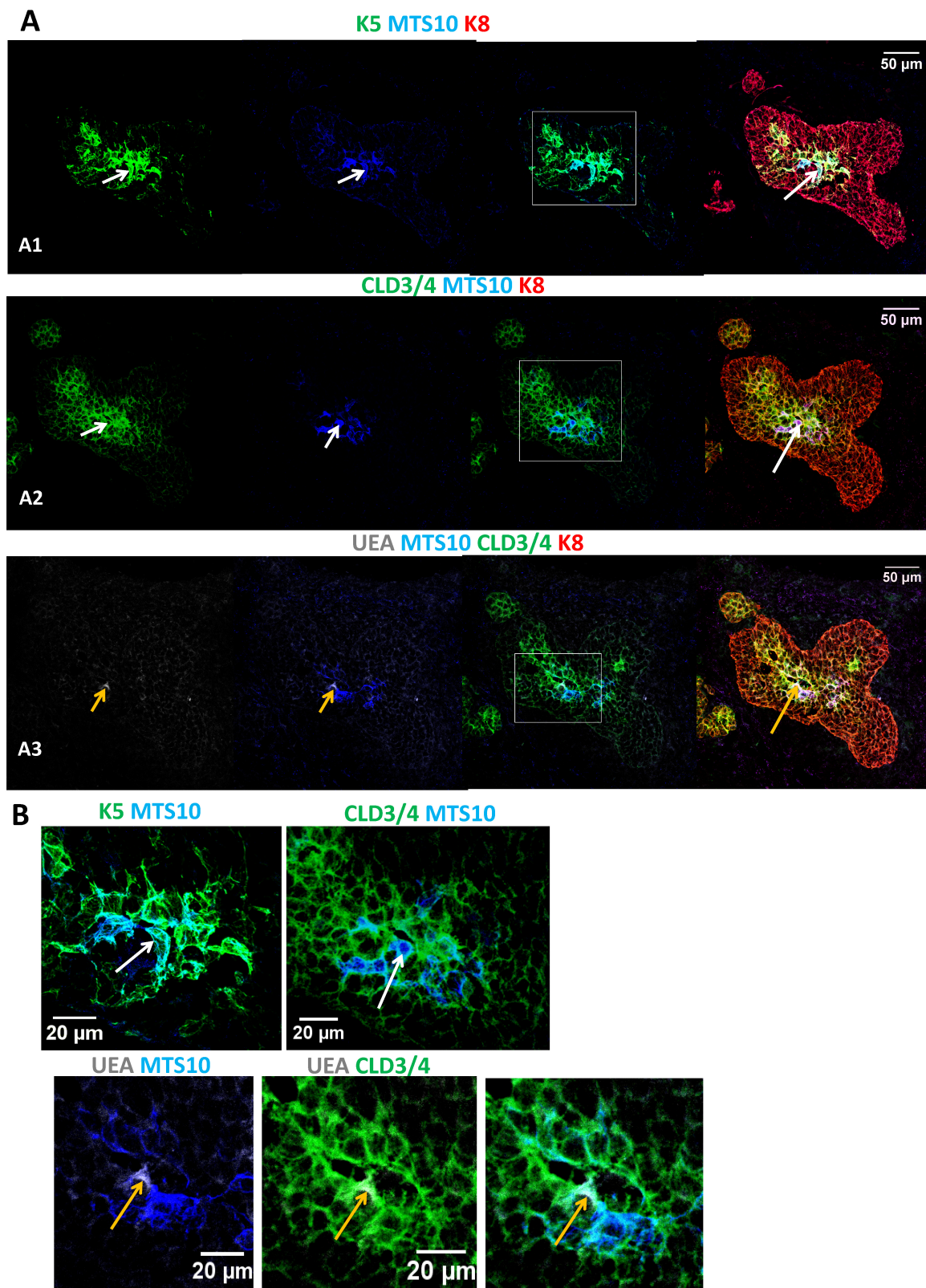


Figura 26 A, B

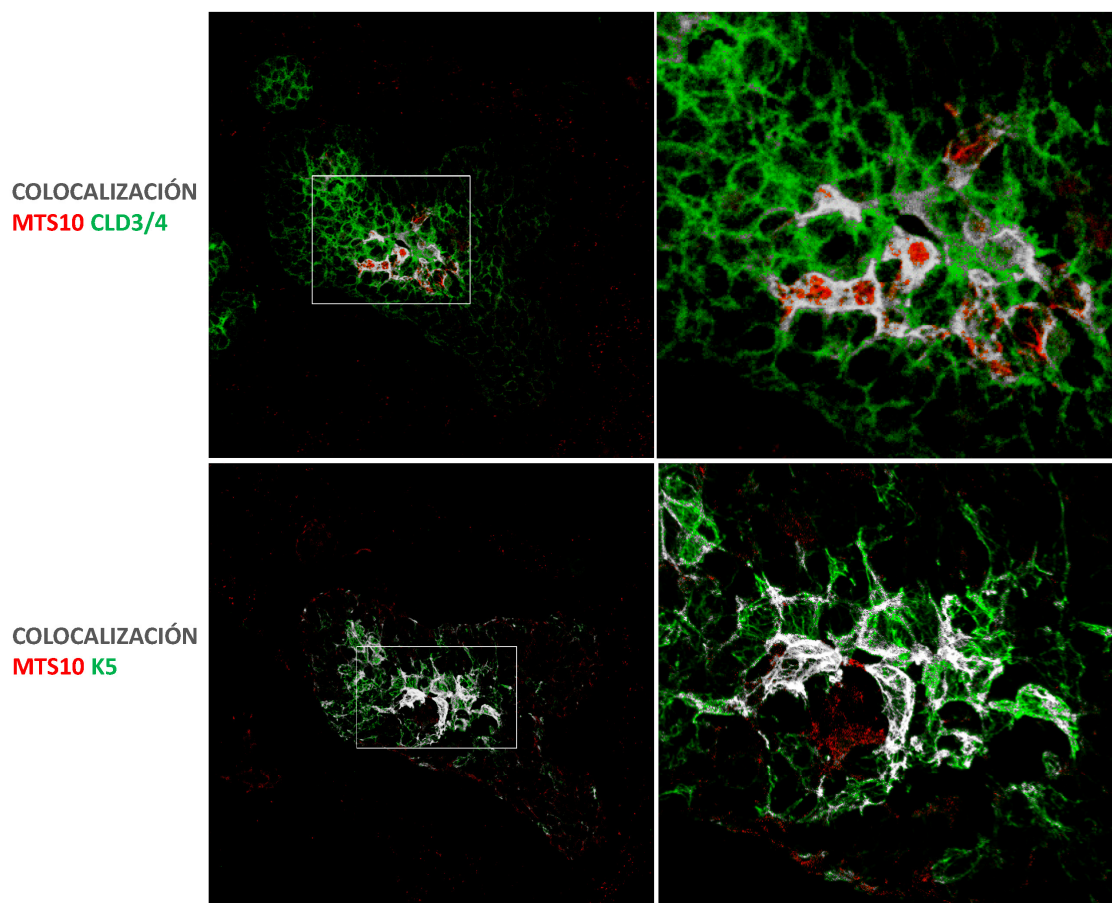


Figura 26 C

Figura 26. En timos *Nude* de 15,5 dpc. *K5* y *MTS10* se expresan en células *Cld3/4*^{hi} que se reorganizan para formar lumen, al que puntualmente se asocian algunas células *UEA*⁺. Crio secciones seriadas de 10 μ m de un lóbulo tímico *Nude* de 15,5 dpc., procesadas para inmunodetección de *K5* (verde), *MTS10* (azul) y *K8* (rojo) (A1) o *Cld3/4* (verde), *MTS10* (azul) y *K8* (rojo) (A2), y *UEA* (gris) (A3) escaneadas con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM; B. Ampliaciones de las zonas enmarcadas en A. Las flechas blancas señalan células *Cld3/4*^{hi} que se reorganizan para formar lumen y expresan *K5* y *MTS10*. Las flechas amarillas señalan células *UEA*⁺ asociadas al lumen. C. Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización (blanco) de *MTS10* (rojo), *Cld3/4* o *K5* (verde). La población *MTS10*⁺ colocaliza en las zonas más centrales del marcaje con *Cld3/4* o *K5*, siendo todas las células *K5* y *MTS10* también *Cld3/4*⁺, aunque la población *Cld3/4*⁺ ocupa una región algo más amplia.

A los 17,5 dpc. (fig. 27) el marcaje de *K5* se había extendido considerablemente y aunque su expresión seguía siendo coincidente con la de *Cld3/4*, el área *K5*⁺ alcanzaba las células más basales (fig. 27 B), de manera que a los 18,5 dpc. (fig. 28) la mayor parte del epitelio tímico *Nude* era *K5*⁺. Así pues, la población *K5*⁺ en este estadio contenía la población *Cld3/4*⁺ y parte de la *Cld3/4*⁻ (fig. 28 B). A los 17,5 dpc. todas las células *MTS10*⁺ seguían siendo células *Cld3/4*^{hi} formadoras de lumen (fig. 27 B, C), mientras que a los 18,5 dpc. observábamos cierta reorganización en la expresión

de MTS10, que aparecía también asociado a células Cld3/4^{lo} en una disposición más basal (fig. 28 B, C). Por otro lado, en comparación con la condición a 15,5 dpc., en estos estadios un mayor número de células expresaba UEA, siempre asociadas a las células Cld3/4^{hi} del lumen (fig. 27 A3, B).

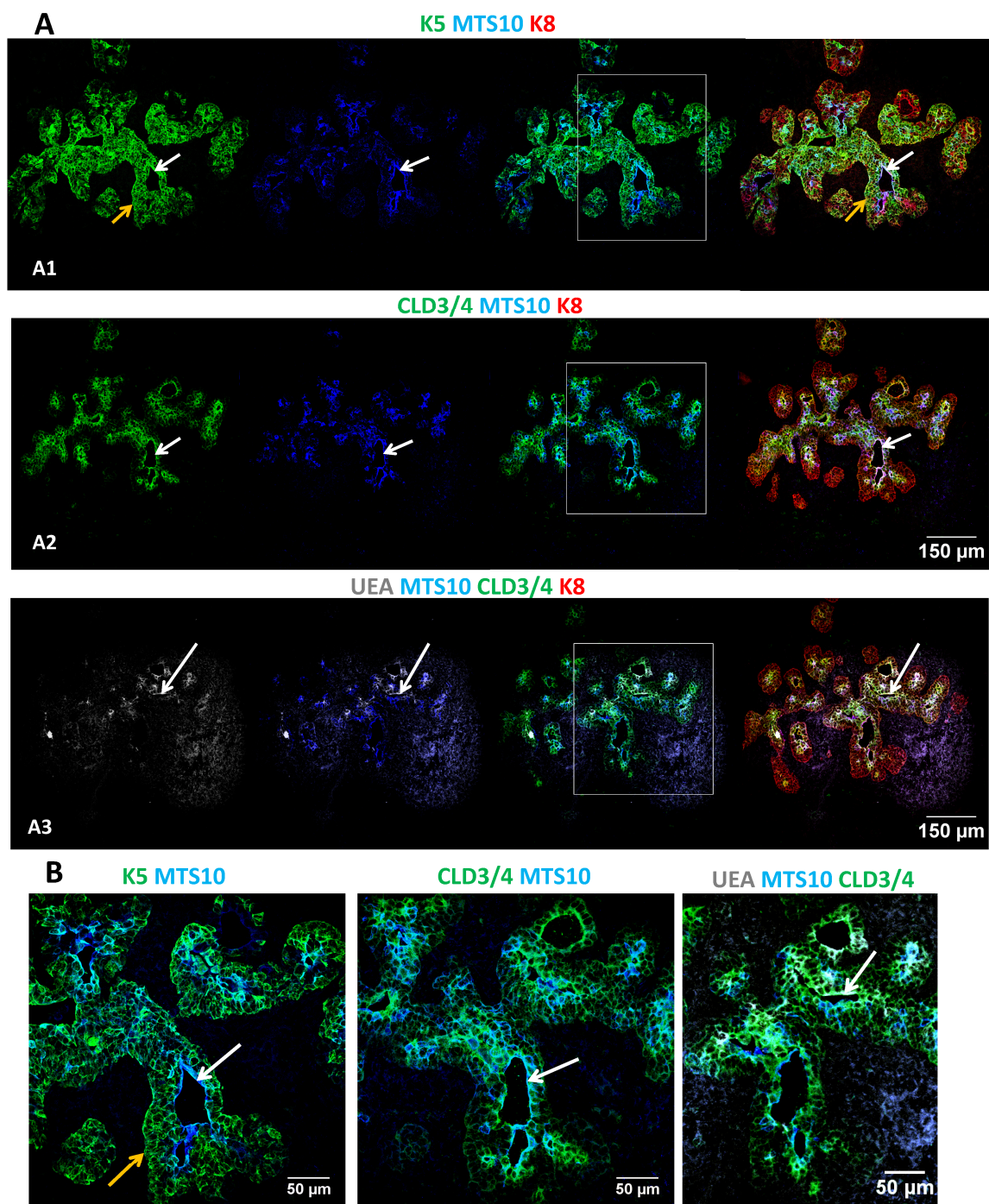


Figura 27 A, B

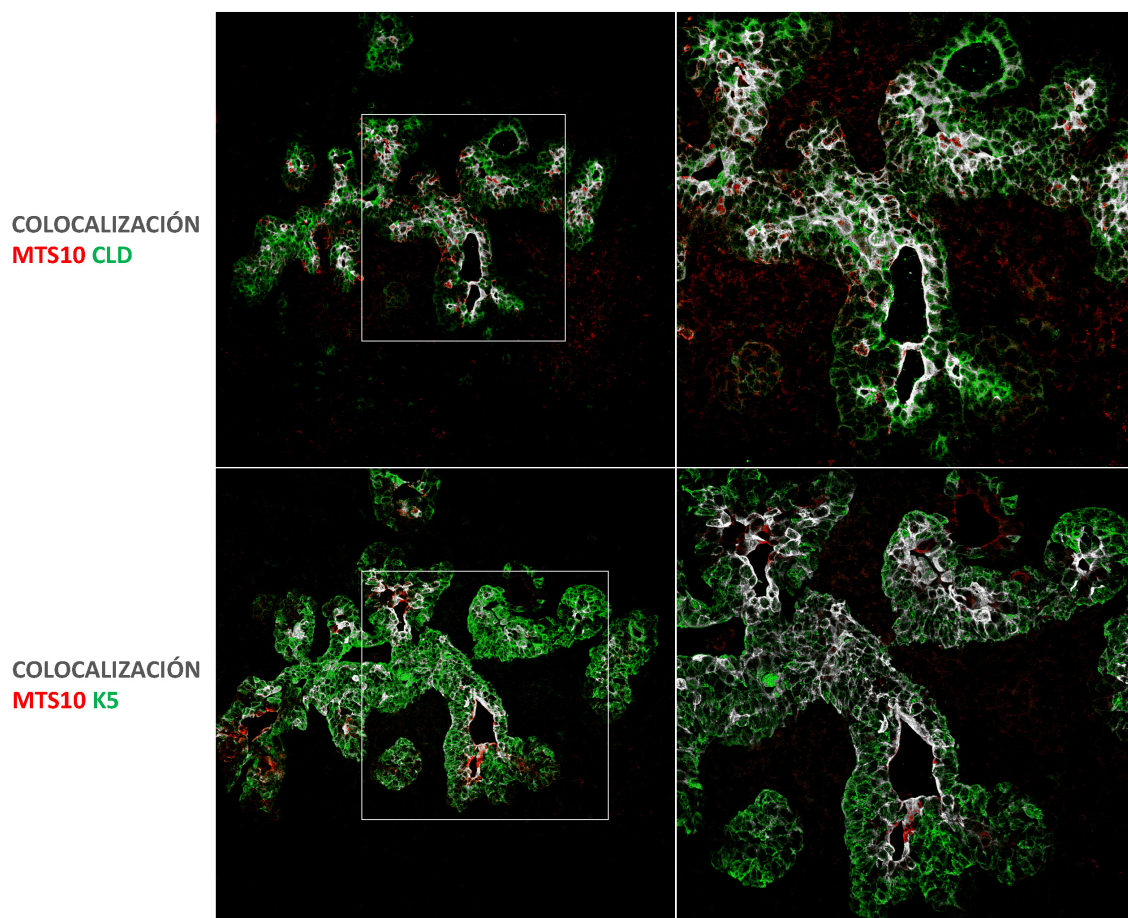


Figura 27 C

Figura 27. En timos *Nude* de 17,5 dpc., MTS10 y UEA se expresan en células *Cld3/4*^{hi} formadoras de lumen dentro de una región *K5*⁺ que se ha extendido hacia zonas basales. Crio secciones seriadas de 10 μ m de un lóbulo tímico *Nude* de 17,5 dpc. procesadas para inmunodetección de *K5* (verde), MTS10 (azul) y *K8* (rojo) (**A1**) o *Cld3/4* (verde), MTS10 (azul) y *K8* (rojo) (**A2**) y UEA (gris) (**A3**) escaneadas con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM; **B.** Detalle de las zonas enmarcadas en A1 y A2. Proyecciones de máxima intensidad de una serie Z con una separación de 0,3 μ m entre planos obtenida con objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Las flechas blancas señalan células asociadas al lumen con un marcaje intenso y polarizado de *Cld3/4*, que expresan también *K5*, MTS10 y de forma puntual UEA. Las flechas amarillas señalan zonas *K5*⁺ en disposición basal que no expresan los otros marcadores. **C.** Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización (blanco) de las expresiones de MTS10 (rojo) con *Cld3/4* o *K5* (verde). Se observa que la población MTS10⁺ colocaliza en gran medida con el marcaje de *Cld3/4* en zonas apicales y con *K5* en las zonas centrales del timo, siendo ahora la población *K5*⁺ mayor que la *Cld3/4*⁺.

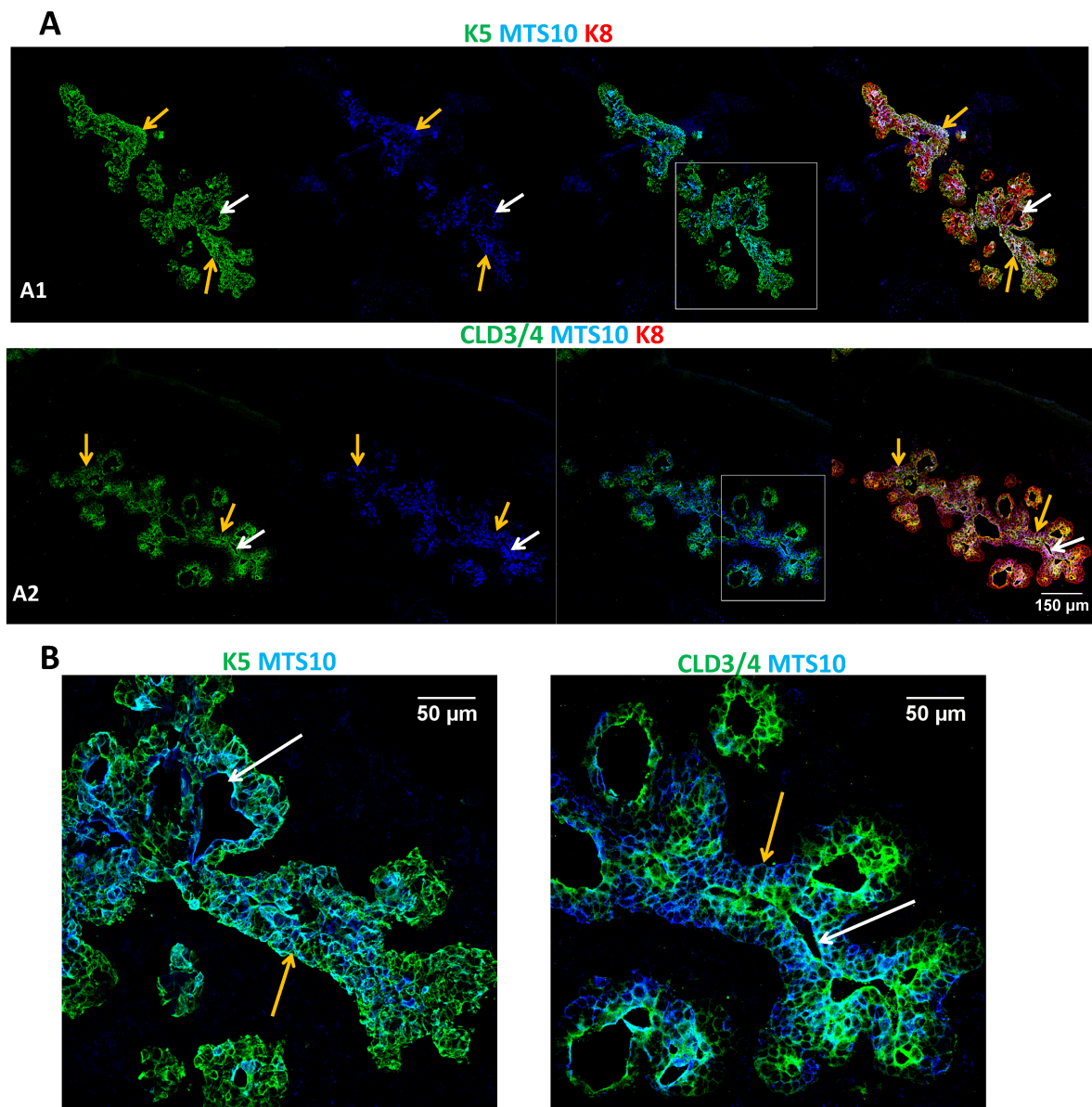


Figura 28 A, B

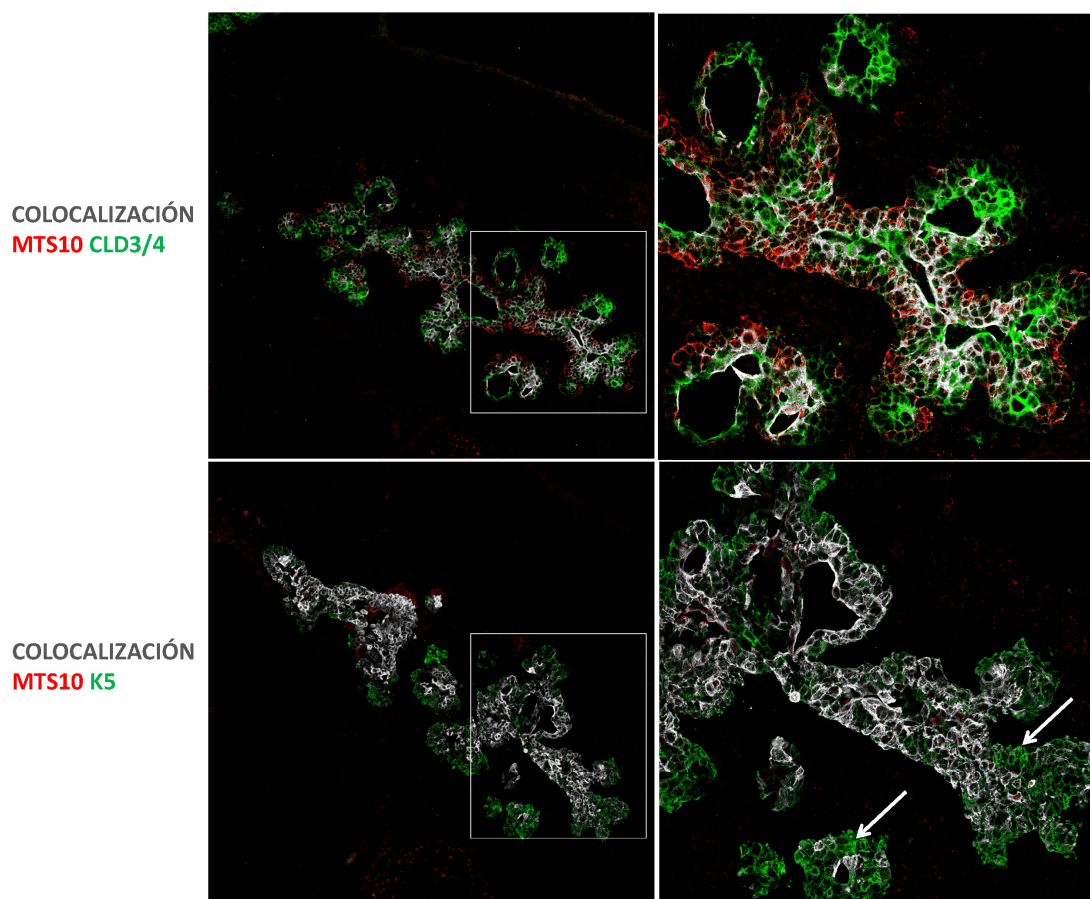


Figura 28 C

Figura 28. En timos *Nude* de 18,5 dpc. cambia el patrón de expresión de MTS10, representando la población K5+ casi la totalidad del epitelio tímico. **A.** Inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A1**) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A2**) sobre criosecciones seriadas de 10 μm de un lóbulo tímico *Nude* de 18,5 dpc. Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. **B.** Detalle de las zonas enmarcadas en A1 y A2, Proyecciones de máxima intensidad de series Z con una separación de 0,3 μm entre planos. Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Se diferencian zonas con distinto grado de evolución en el proceso de formación de lumen. K5 se expresa de forma generalizada englobando el marcaje de MTS10 y el de Cld3/4. Aparece expresión de K5 y MTS10 en células con disposición basal que expresan Cld3/4 con menor intensidad (Cld3/4^{lo}) no asociadas a lumen (flechas amarillas) y células asociadas al lumen Cld3/4^{hi} que polarizan la expresión de Cld3/4 y expresan K5 y MTS10 como en estadios anteriores (flechas blancas). **C.** Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización (blanco) de la expresión de MTS10 (rojo) con Cld3/4 o K5 (verde). Se observa que la población MTS10+, además de colocalizar en zonas luminales con la población Cld3/4+, se dispone también en áreas externas a éstas, más basales (rojo). La distribución de las regiones MTS10+ y K5+ coincide en gran medida aunque se evidencia claramente una población MTS10- K5+ (flechas).

Por tanto, desde el final del desarrollo fetal (18,5 dpc.) y en estadios postnatales (figs. 28, 29), al tiempo que se definía la estructura tímica definitiva, se producía un cambio progresivo en la expresión de los marcadores epiteliales que reflejaba la diferenciación de distintas células en las zonas monoestratificadas y, en el caso de las zonas bi o pluriestratificadas, su estratificación. En estas últimas se diferenciaba la capa celular apical donde las células Cld3/4^{hi} se localizaban asociadas al lumen, expresaban K5 y regulaban negativamente la expresión de MTS10, y la capa basal Cld3/4⁻ que adquiría expresión de MTS10 y K5, quedando, por tanto, finalmente MTS10 en disposición esencialmente basal y con una expresión discontinua, y K5 con una disposición en capas basales y apicales (fig. 29 B). Además, en las zonas más pluriestratificadas distinguíamos capas intermedias, generalmente MTS10 y K5 negativas que expresaban débilmente Cld3/4 (Cld3/4^{lo}) (fig. 29, zona A). En las zonas que finalmente quedaban como monoestratificadas, la expresión de MTS10 se iba restringiendo a una porción de las células dispuestas de forma discontinua. Algo similar ocurría con la expresión de K5 que se localizaba tanto en las zonas basales como en las apicales aunque no de forma continua, quedando finalmente también regionalizado dentro de esas zonas monoestratificadas (fig. 29, zona B). El marcador UEA estaba restringido a unas pocas células apicales asociadas al lumen en la zona pluriestratificada escamosa del timo *Nude* (fig. 29 A). Como sugerían imágenes a mayores aumentos (fig. 29 B) aparentemente, o así parecía indicarlo la morfología celular, el proceso de formación de la estructura tubular no implicaba sólo una diferenciación de las células de forma local, sino el movimiento y remodelación de las mismas, como ya se ha descrito en páncreas, glándula salival, mama, etc. (Hieda y cols., 1996; Nanba y cols., 2001; Villaseñor y cols., 2010).

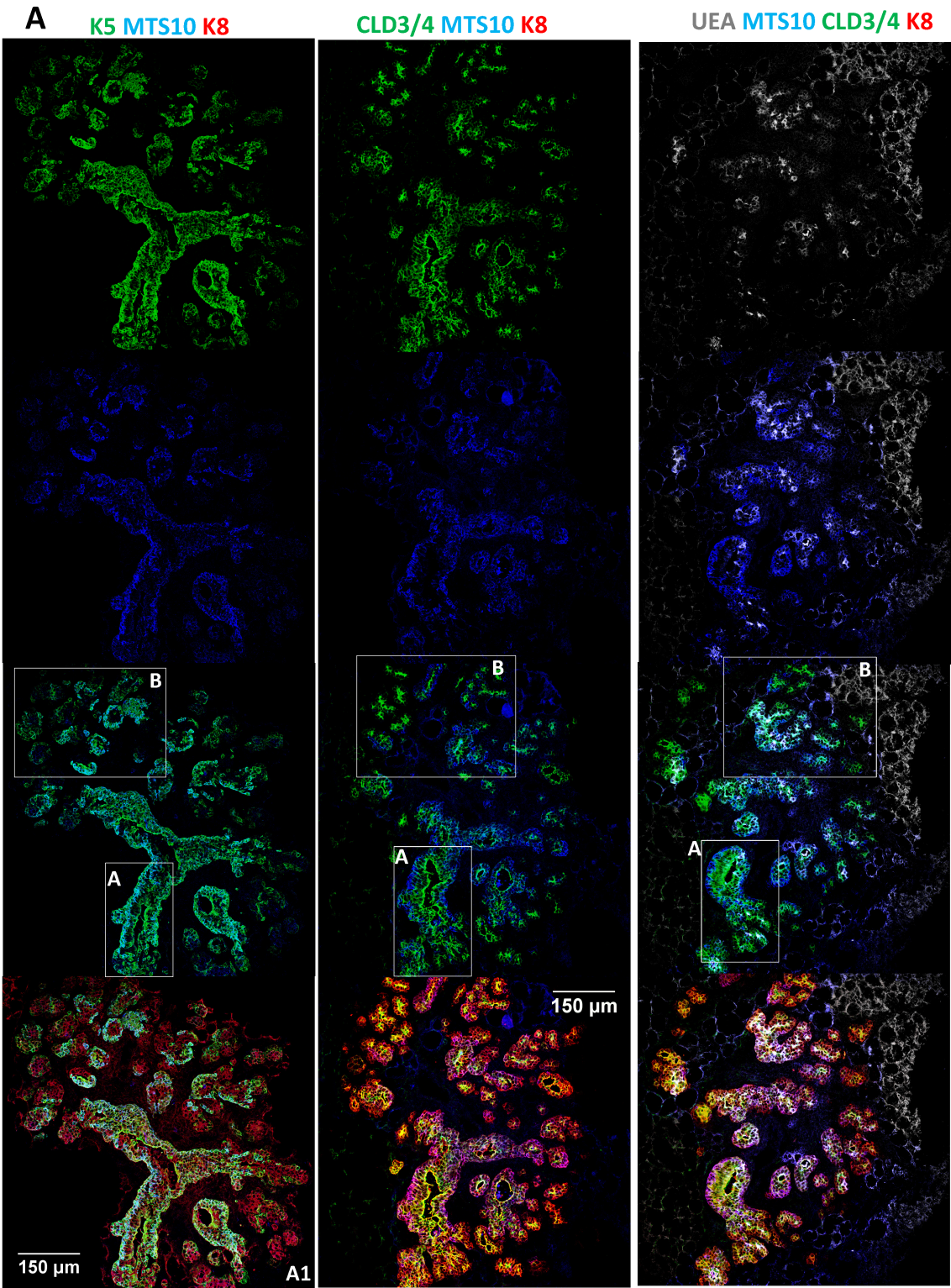
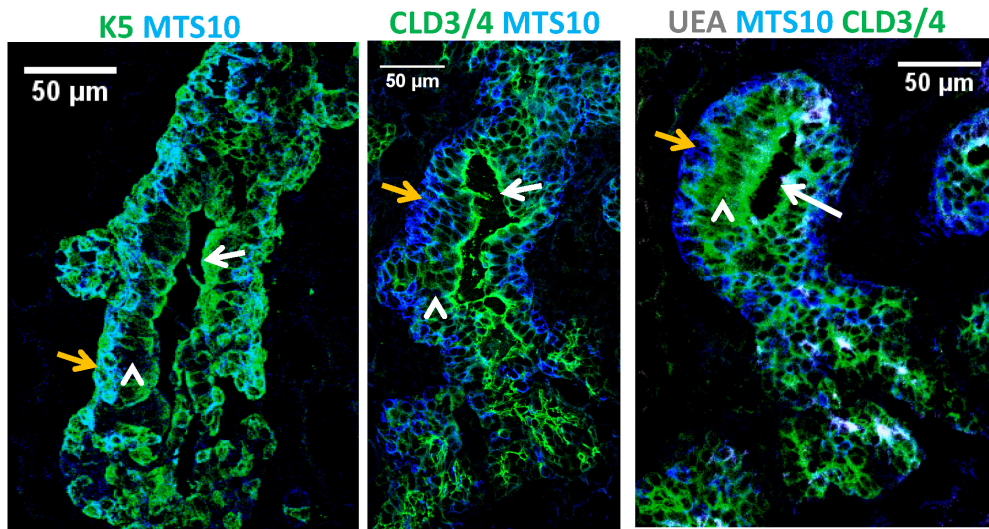


Figura 29 A

ZONA A (TRONCAL)



ZONA B (DISTAL/ACINAR)

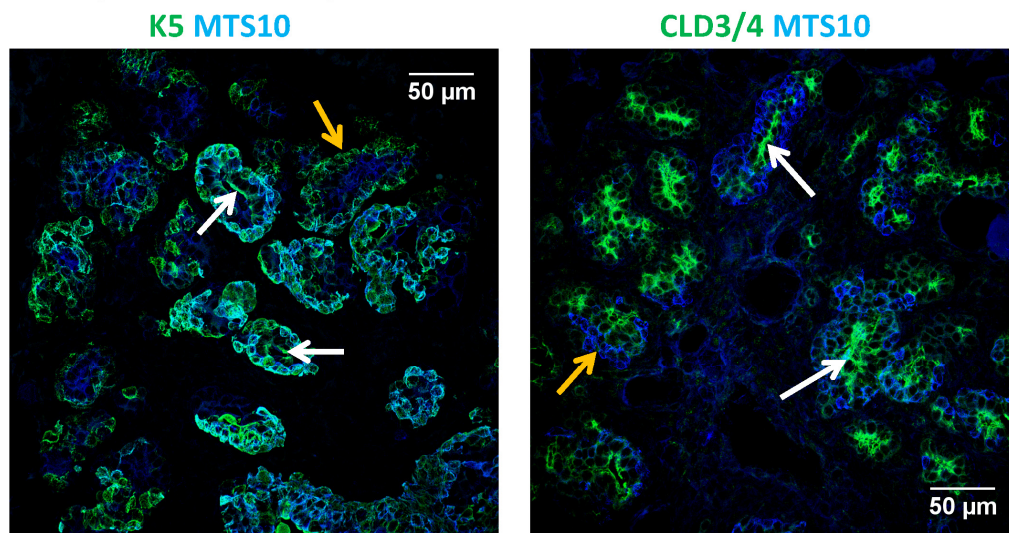


Figura 29 B

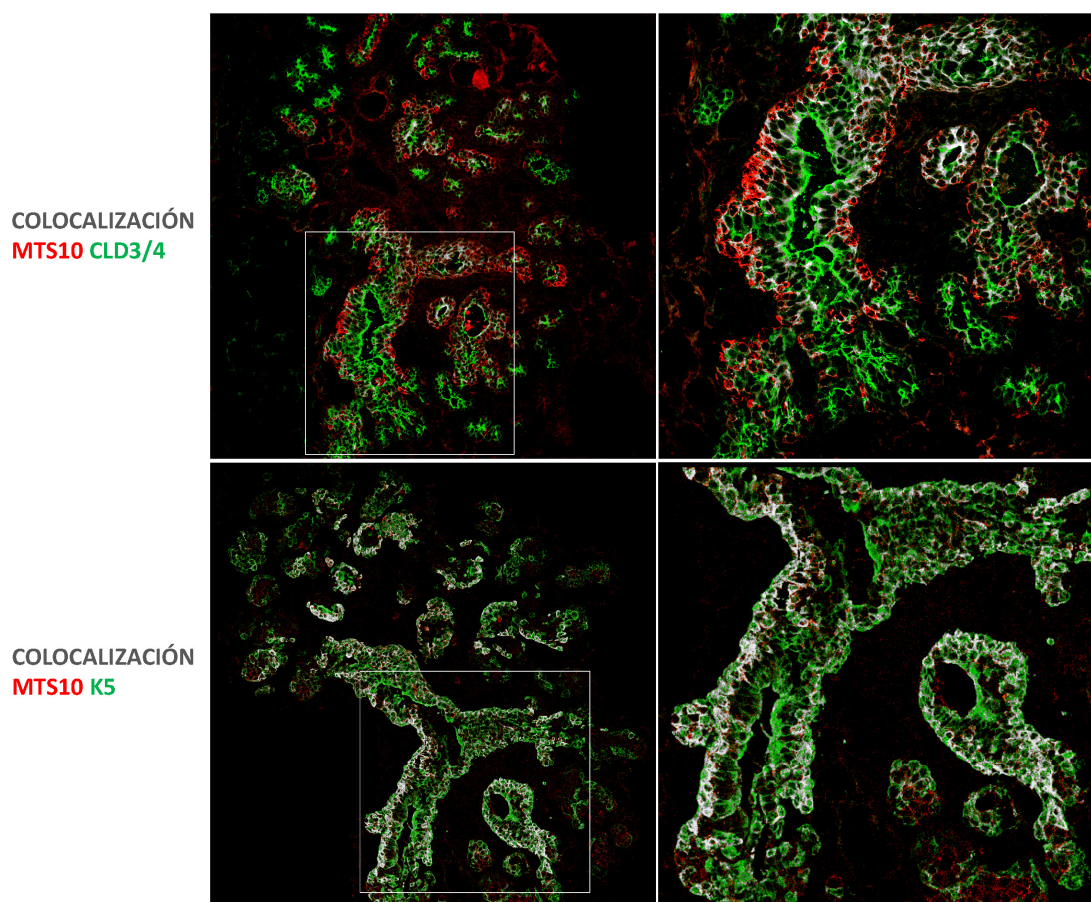


Figura 29 C

Figura 29. Los timos Nude de 15PN presentan dos zonas diferenciadas, una zona troncal pluriestratificada definida por la disposición en capas de MTS10, Cld3/4 y K5 y una zona distal mono/biestratificada. Criosecciones seriadas de 10 μ m procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A1) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A2), y UEA (gris) (A3) Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM.; B. Proyecciones de máxima intensidad de las zonas enmarcadas en A1, A2 o A3 de series Z con una separación de 0,4 μ m entre secciones. Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. En la zona A o zona troncal formada por un epitelio pluriestratificado, las flechas blancas señalan la capa apical asociada al lumen Cld3/4^{hi} MTS10-K5+ que en ocasiones expresa también UEA, las cabezas de flechas las capas intermedias Cld3/4^{lo} MTS10-K5- y las flechas amarillas las capas más basales Cld3/4-K5+MTS10+. En la zona B o zona distal/acinar, formada por un epitelio mono o biestratificado, se observa una expresión de K5 discontinua en algunas zonas apicales Cld3/4^{hi} (flechas blancas) y una expresión de MTS10 y K5 también discontinua en algunas zonas basales (flechas amarillas). C. Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización (blanco) de las expresiones de MTS10 (rojo), Cld3/4 y K5 (verde). Se observa que la población MTS10+ tiene una disposición basal con respecto a la región Cld3/4+ en las zonas más estratificadas, colocalizando allí con la población K5+.

En resumen, nuestros resultados sobre la evolución del epitelio tímico de ratones *Nude* indican que la queratina 8, que se expresa en el timo *wt* adulto en la corteza, se expresa en el timo *Nude* por todo el epitelio y los marcadores medulares MTS10 y K5 asociados inicialmente con las células Cld3/4⁺ formadoras de lumen, posteriormente, en el timo postnatal, se localizan basalmente en las zonas más estratificadas, mientras las células apicales Cld3/4^{hi}, que generalmente expresan UEA, quedan mayoritariamente como células MTS10- aunque mantienen la expresión de K5. Los distintos marcadores se asocian inicialmente, por tanto, con la formación de lumen y, posteriormente, con la diferenciación de estratos en las partes estratificadas y de subpoblaciones celulares concretas en las regiones monoestratificadas distales.

2. Desarrollo del epitelio tímico en presencia de FoxN1 pero ausencia de colonización linfoide: Estudio de timos de ratones *NSG* e *Ikaros*^{-/-}.

Con el fin de identificar patrones epiteliales que permitiesen una comparación con el timo de ratones *Nude* y tratar de establecer las modificaciones que sobre el desarrollo del rudimento tímico inicial pudiera introducir la expresión de FoxN1, analizamos el desarrollo tímico de ratones *NSG* e *Ikaros*^{-/-}. Ambos mutantes carecen de células linfoides en el timo, aunque este extremo ha sido mejor caracterizado en el caso de ratones *Ikaros*^{-/-}, en los que la diferenciación linfoide está bloqueada ya en el hígado fetal por lo que no existen precursores linfoides capaces de colonizar el timo embrionario. Sin embargo, en los ratones *Ikaros*^{-/-} aquí estudiados la médula ósea genera precursores linfoides que colonizan postnatalmente el timo (*Wang y cols.*, 1996). Por el contrario, el timo de ratones *NSG* carece de diferenciación linfoide intratímica durante toda su vida (*Shultz y cols.*, 2005). Consiguientemente, utilizamos los ratones *NSG* e *Ikaros*^{-/-}, estos últimos prenatales, como un modelo para estudiar el desarrollo tímico en presencia de FoxN1 pero ausencia de timocitos. Utilizamos el modelo de *Ikaros*^{-/-} postnatal para evidenciar las modificaciones introducidas por la colonización linfoide postnatal sobre este desarrollo, lo que permite observar el efecto de la expresión de FoxN1 y la presencia de precursores linfoides separados secuencialmente, en lugar de actuar simultáneamente como en la condición *wt*.

2.1. El timo de ratones NSG postnatales presenta algunas características similares a las observadas en el de ratones Nude.

Analizamos en primer lugar la estructura epitelial del timo de ratones *NSG* de 20 días postnatal mediante inmunomarcaje para E-cadherina y Cld3/4 de criosecciones seriadas orientadas dorsoventralmente (fig. 30), realizando, posteriormente, la reconstrucción tridimensional de los mismos (fig. 31). En las series de secciones podía observarse un órgano ligeramente lobulado, alinfoide, con algunas características similares a las observadas en el timo *Nude*. En la parte superior del lóbulo podían observarse grandes quistes monoestratificados (fig. 30 A, 1-9) delimitados por células Cld3/4+ (fig. 30 B), similares a los grandes tubos/sáculos del timo *Nude* (ver fig. 9). En su proximidad, al igual que en el caso del timo *Nude*, podían observarse estructuras de tipo acinar (fig. 30 A, B). El marcaje de Cld3/4 definía una serie de grandes quistes en la zona central del órgano (fig. 30 A, C) y, hacia su periferia, pequeños quistes o focos de polarización en las zonas centrales de los lobulillos (fig. 30 A, D).

La reconstrucción tridimensional a partir de las secciones seriadas mostraba que el timo *NSG* postnatal era una estructura ligeramente lobulada en la que los lobulillos estaban muy fusionados entre sí (fig. 31). En el interior se observaba que, aunque la estructura definida por el marcaje de Cld3/4 esbozaba una estructura ramificada a partir de los lúmenes centrales, no era continua (fig. 31). En el caso del lumen, un análisis en detalle confirmaba que ni aún en el caso en que se observaba continuidad del marcaje definido por Cld3/4 el lumen era continuo (fig. 32). Así pues, la estructura definida en el timo *Nude* con un lumen central único continuo (ver figs. 9-12), se observaba ahora como una estructura lobulada más engrosada con un lumen discontinuo, en la que en la zona troncal se definían quistes de mayor tamaño en ocasiones conectados por cordones celulares Cld3/4+ (fig. 32 A, B) y en la zona distal focos de polarización que definían rosetas o pequeños lúmenes o quistes en general aislados (fig. 32 A, C).

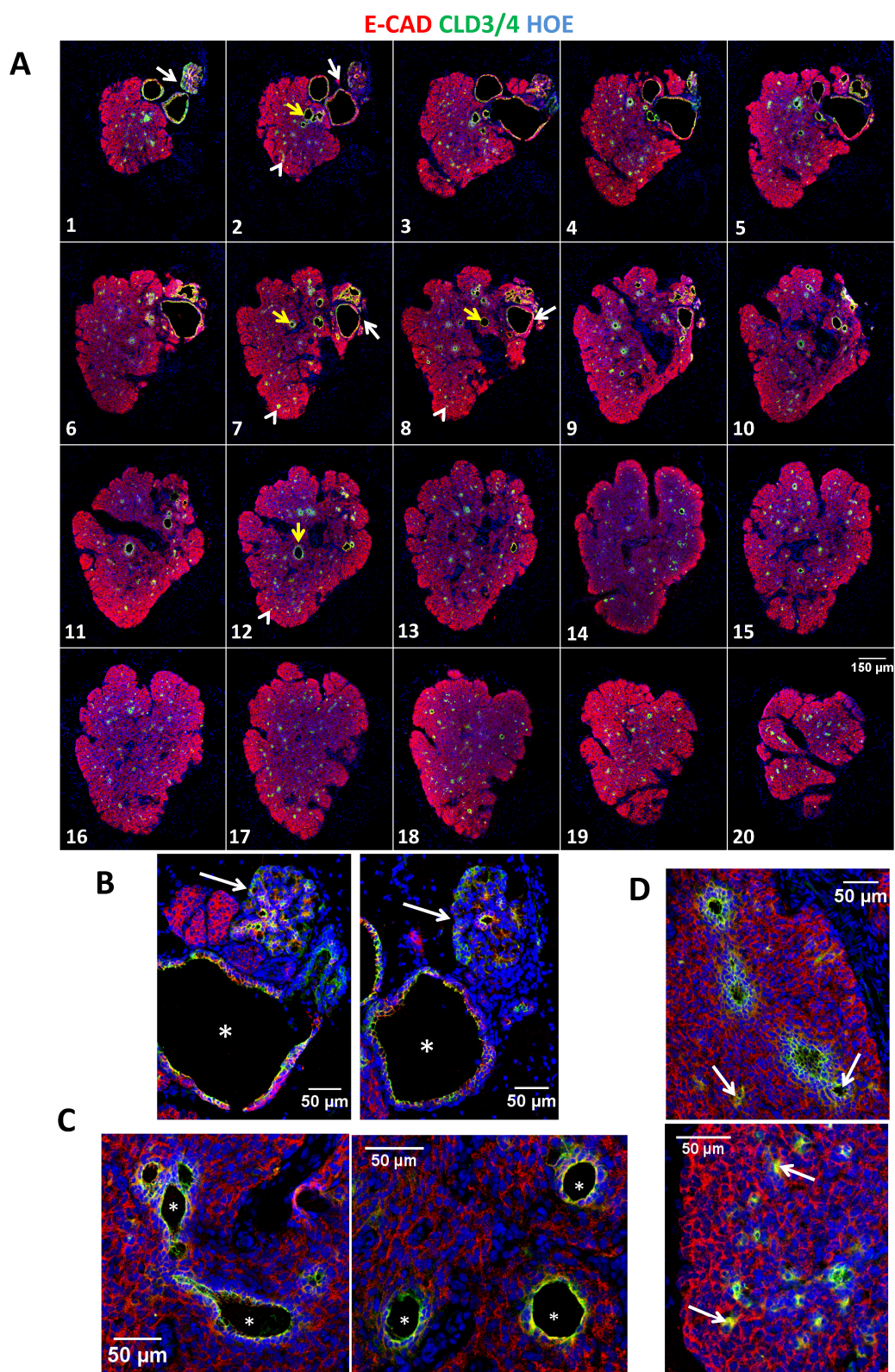


Figura 30. El timo postnatal (20 días) NSG es una estructura epitelial lobulada con dos zonas diferenciadas. A. Criosecciones seriadas de 10 µm de grosor, procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Los números indican el orden de las secciones. Se observa una zona periférica (flechas blancas) con grandes quistes y una parte “acinar” con pequeños lúmenes, una zona central con lúmenes de distinto tamaño (flechas amarillas) y, hacia la periferia pequeños lúmenes y focos de polarización en las zonas centrales de los lobulillos

(cabezas de flecha). **B.** Detalle de las zonas señaladas con flechas blancas en A, objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa la zona acinar (flechas) próxima a los grandes quistes periféricos (asteriscos). **C.** Detalle de las zonas centrales del lóbulo, donde se observan grandes lúmenes centrales (asteriscos). **D.** Pequeños quistes y focos de polarización en la zona periférica (flechas).

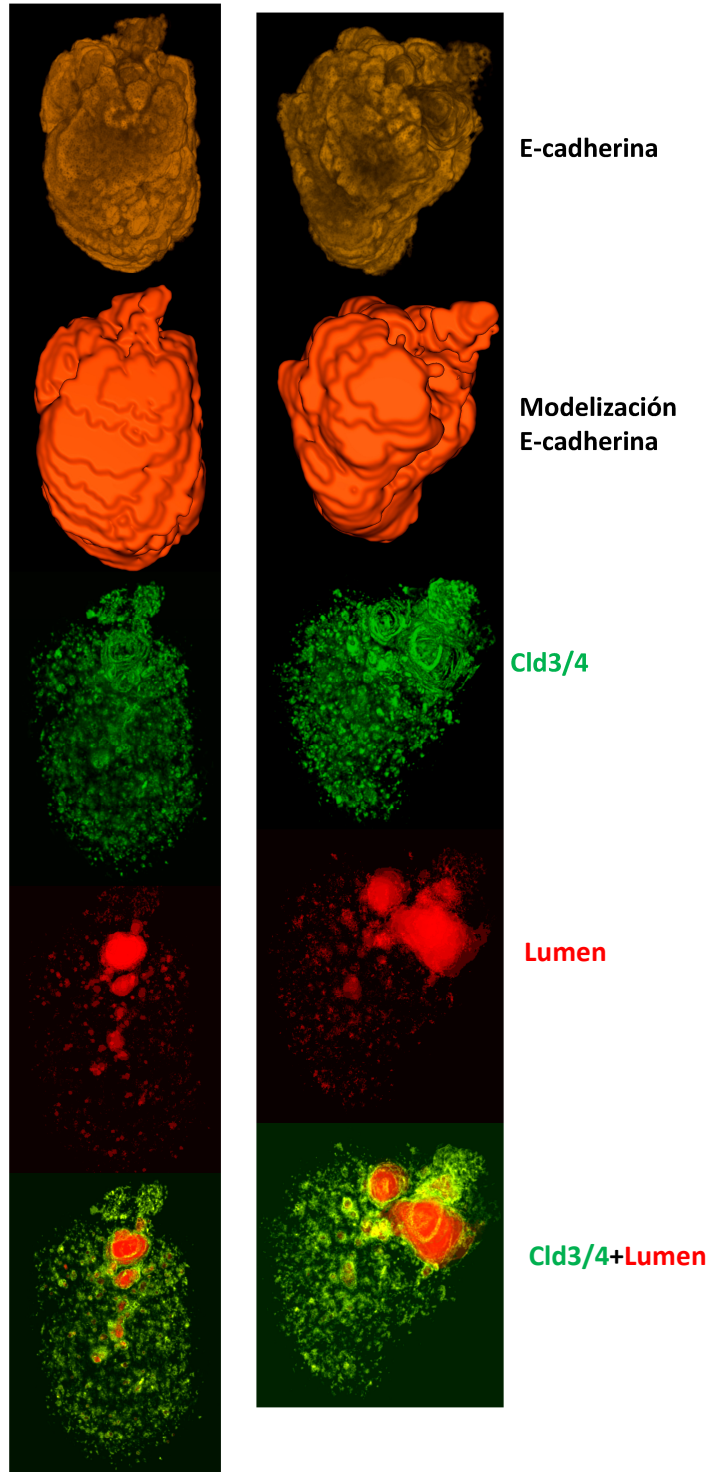


Figura 31. Reconstrucciones tridimensionales de lóbulos tímicos postnatales de ratones NSG.

Reconstrucciones tridimensionales de dos lóbulos tímicos de ratones NSG de 20 PN, a partir de criosecciones seriadas de 10 μ m procesadas para inmunodetección de E-cadherina y Cld3/4. Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa una estructura externa con lobulillos muy fusionados entre sí y un marcaje de Cld3/4 de apariencia ramificada pero no continuo (verde) con grandes lúmenes ciegos o quistes (identificados en color rojo) en la zona superior y central, más troncal, y pequeños lúmenes o quistes y microlúmenes en la periferia o zona distal.

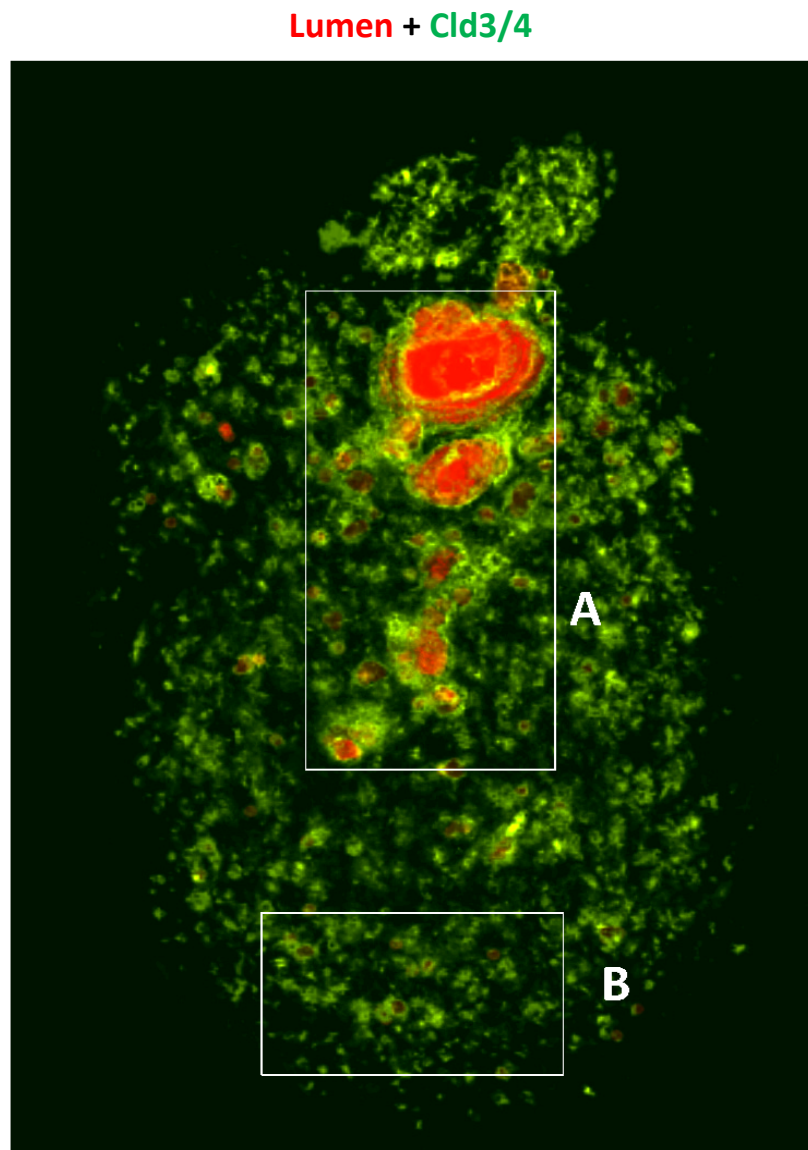


Figura 32 A

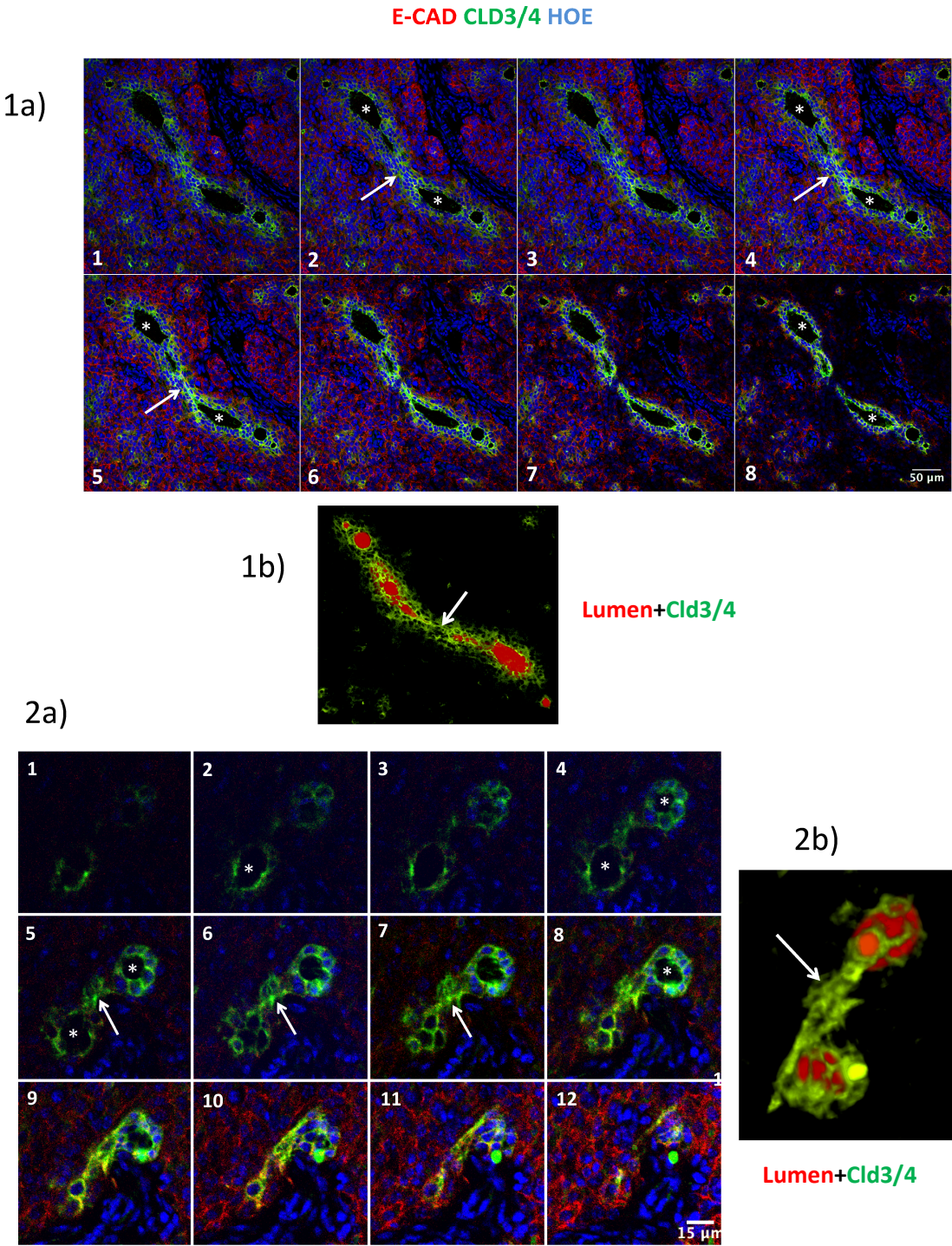


Figura 32 B

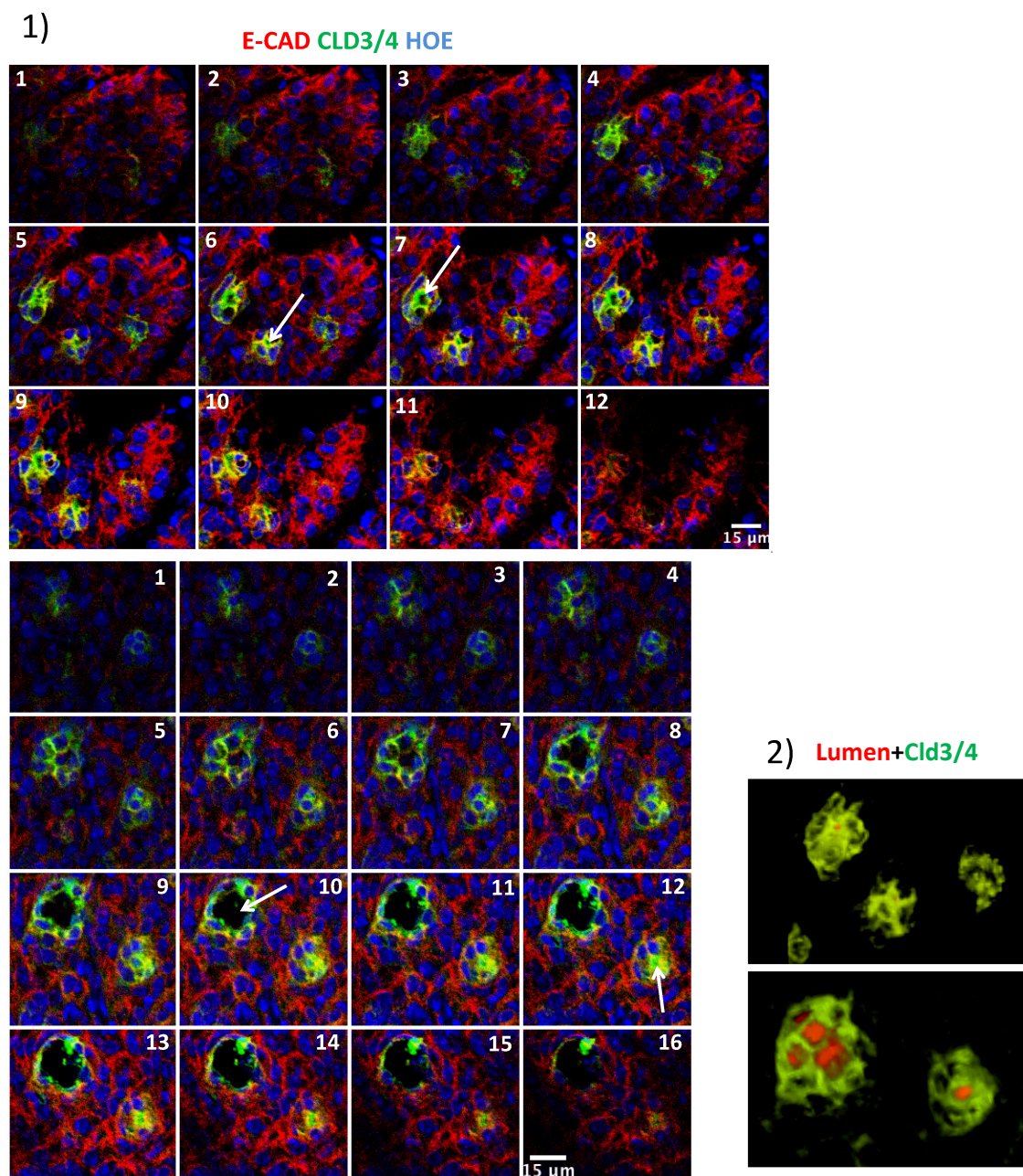


Figura 32 C

Figura 32. Estructura del lumen en timos adultos NSG de 20 días postnatal. A. Reconstrucción tridimensional obtenida a partir de crio secciones seriadas de 10 μm procesadas para inmunodetección de Cld3/4. Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa en verde el marcaje de Cld3/4 y en rojo el lumen; se distinguen dos zonas, una troncal con lúmenes más grandes (zona A) y otra distal con pequeños lúmenes (zona B). B. Los lúmenes de la zona troncal (zona A de la figura anterior) de timos adultos NSG son discontinuos y están conectados entre sí por cordones celulares Cld3/4+. La serie muestra secciones de una crio sección de 10 μm procesada para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul) escaneada en xyz con objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV con una separación de 0,5 μm (1a) o de una crio sección de 120 μm escaneada objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 0,7 μm entre cada sección (2a) y sus reconstrucciones tridimensionales (1b y 2b). Los números indican el orden de las secciones. Se observan cordones celulares Cld3/4+ (flechas) que conectan lúmenes (rojo, asteriscos) aislados entre sí. C. Los timos adultos NSG

presentan lúmenes aislados de pequeño tamaño en su zona distal (zona B de la figura 23A). Secciones obtenidas al escanear en xyz con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM zonas periféricas de una criosección de 120µm con una separación de 0,7 µm entre cada sección **(1)** y sus reconstrucciones tridimensionales **(2)**, donde se observa que hay lúmenes independientes (flechas, rojo) rodeados por células polarizadas Cld3/4^{hi} (verde) en forma de quistes (inferior) o sin apenas lumen formando rosetas (superior), en ambos casos no conectados por el marcaje de Cld3/4.

2.2. La presencia de FoxN1 inhibe el proceso de diferenciación apical y desestratificación observado en el timo Nude.

Al igual que hicimos con los timos *Nude* analizamos la estructura del timo de ratones *NSG* durante el desarrollo, de nuevo mediante inmunofluorescencia para E-cadherina y Cld3/4 bien “in toto” o bien mediante reconstrucción de cortes seriados.

El timo *NSG* de 13,5 dpc. era estructuralmente muy similar al timo *Nude* a tenor del análisis realizado de su desarrollo mediante inmunomarcaje para E-cadherina y Cld3/4 “in toto” (fig. 33). El esbozo tímico en este estadio del desarrollo consistía en una estructura más o menos fusiforme formada por una masa epitelial estratificada (fig. 33 A) en la que se identificaba una región central Cld3/4+ (fig. 33 B), algo más ramificada que en caso del timo *Nude* (ver figs. 15-16), aunque no se distinguía claramente el lumen central.

A los 15,5 dpc., el grado de lobulación del timo *NSG* era mayor (fig. 34 A) que en el caso del timo *Nude* (ver fig. 17) y resultaba más difícil establecer ramificaciones ya que en ocasiones éstas aparecían anastomosadas, lo que recordaba a lobulillos limitados por un sistema de trabéculas, como en el timo *wt* (ver luego) (fig. 34 A, 35). En el interior, como en el timo *Nude*, se identificaba una estructura central ramificada y continua que expresaba Cld3/4 (fig. 35). La tinción para Cld3/4 definía un marcaje en ocasiones de aspecto reticular de células que de forma puntual dejaban pequeños huecos entre ellas igual que en el caso del timo *Nude* pero, a diferencia de éste, no se apreciaba polarización del marcaje indicativo de diferenciación de membrana apical o formación de lumen. No se observaban microlúmenes, ni alineamientos celulares que definiesen canales o trazados de polarización, ni focos de polarización locales que definiesen rosetas (fig. 34 B), como se observaba en el timo *Nude* de la misma edad (ver fig. 18).

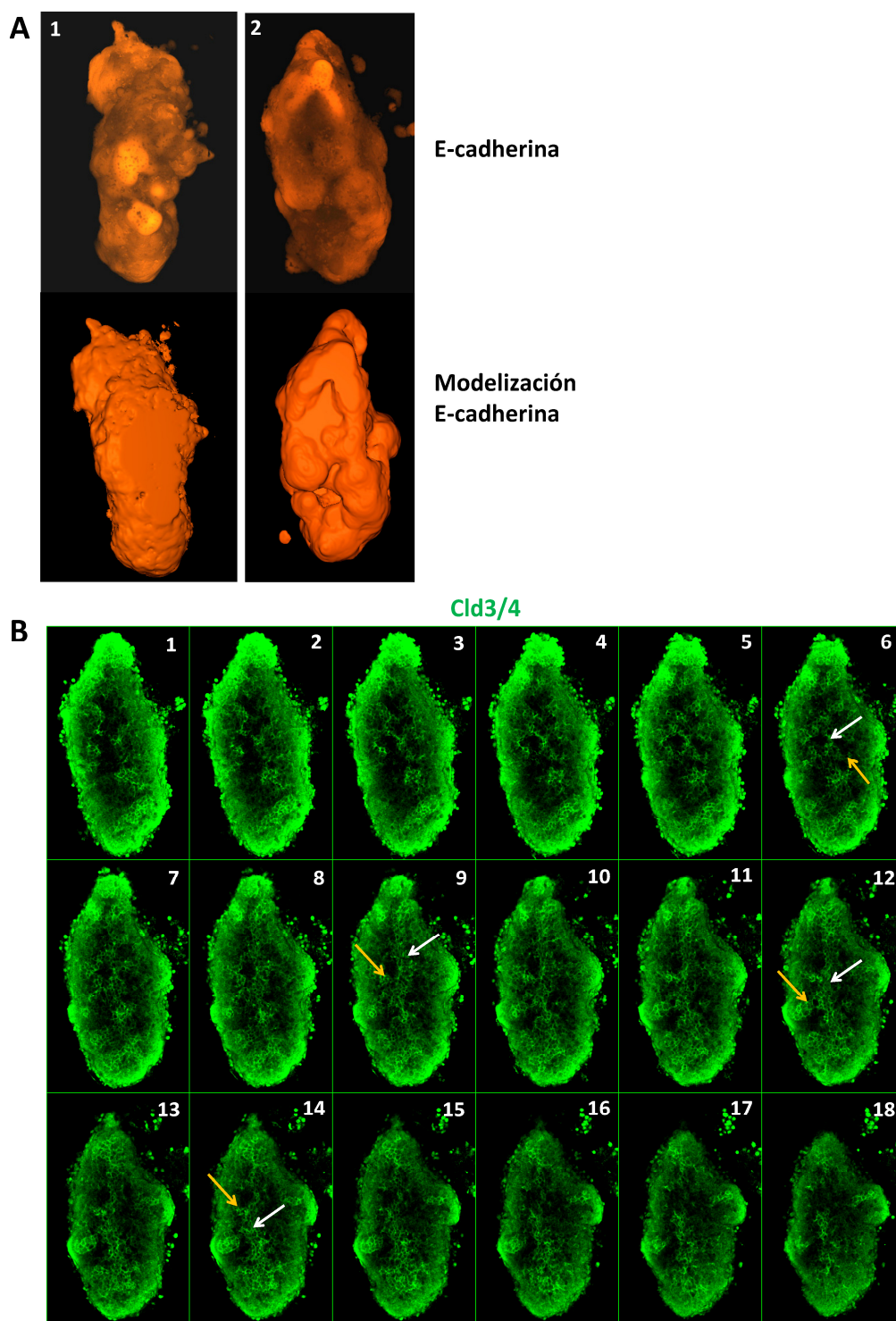


Figura 33. El timo NSG de 13,5 dpc. es una estructura epitelial fusiforme con una disposición central de Cld3/4 continua y ligeramente ramificada. **A.** Reconstrucciones tridimensionales de la estructura externa de dos lóbulos tímicos de 13,5 dpc., obtenidos por procesamiento de los mismos para inmunodetección “in toto” de E-cadherina. Las imágenes a partir de las cuales se hicieron las reconstrucciones se obtuvieron con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 1 μ m entre cada sección. Se observa una estructura epitelial fusiforme con una lobulación incipiente. **B.** Imágenes seriadas obtenidas de un lóbulo tímico NSG de 13,5 dpc. procesado para inmunodetección “in toto” de Cld3/4 escaneado en xyz con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM con una separación de 1 μ m entre cada sección. Se observa en la zona central del timo, una expresión continua de Cld3/4 (flechas blancas) con pequeñas ramificaciones (flechas amarillas).

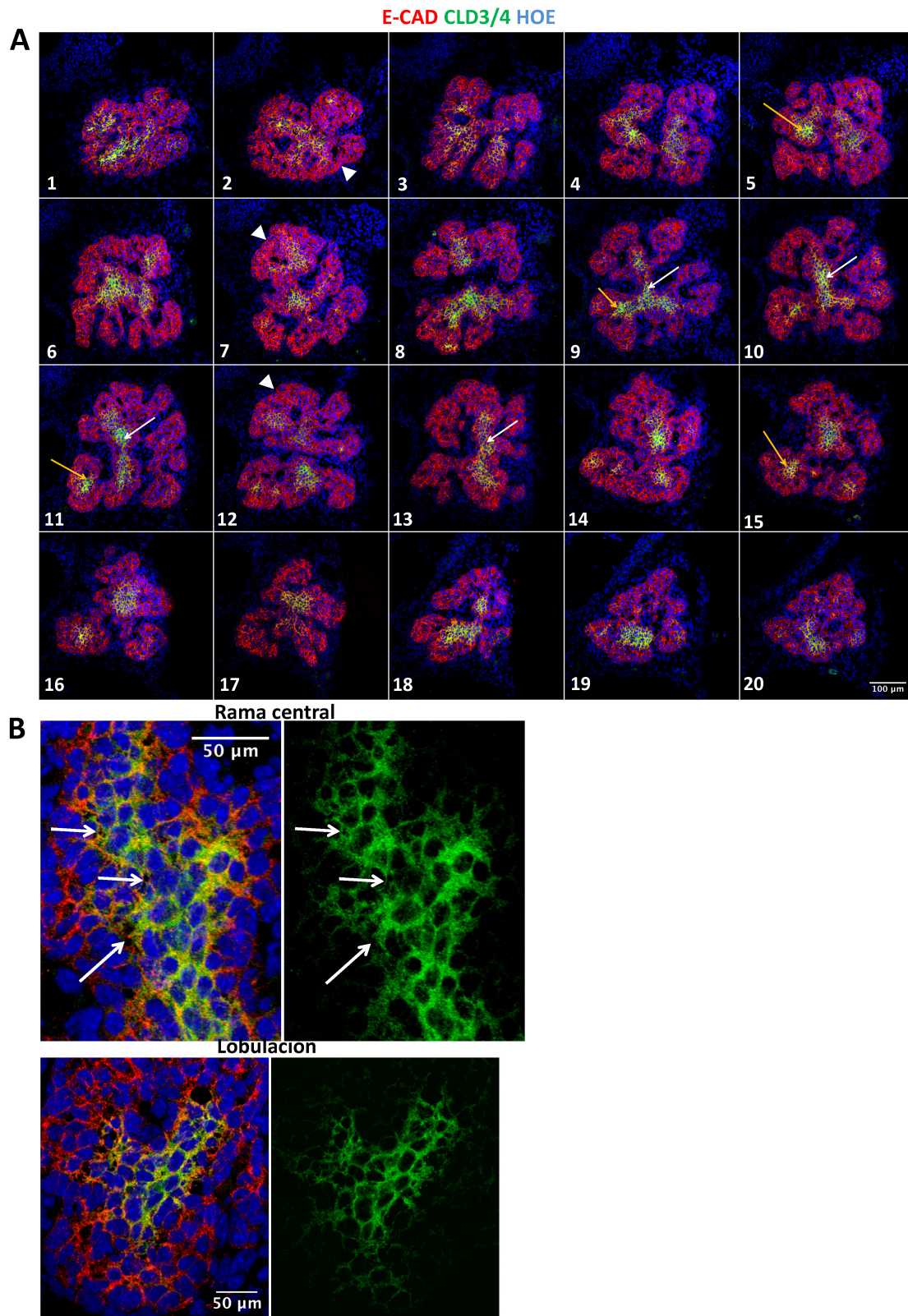


Figura 34. El timo NSG de 15,5 dpc. es una estructura epitelial lobulada con una expresión central de *Cld3/4* que ramifica hacia las lobulaciones. **A.** Criosecciones seriadas de 10 µm de un timo NSG de 15,5 dpc. procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), *Cld3/4* (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa una estructura con ramas que parten de un eje central (foto 9) en muchas ocasiones anastomosadas (cabezas de flecha) quedando en forma de lobulaciones con continuidad entre ellas y separadas por un entramado de trabéculas. En el interior se observa un

marcaje continuo de Cld3/4 en el centro de la estructura (flechas blancas) y las zonas centrales de las lobulaciones (flechas amarillas). **B.** Detalles de la figura A (objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV). La expresión de Cld3/4 no se polariza en las células de la región central, dejando en ocasiones pequeños espacios intercelulares (flechas). No se aprecian polarizaciones o alineamientos de las células formando canales o trazados de polarización.

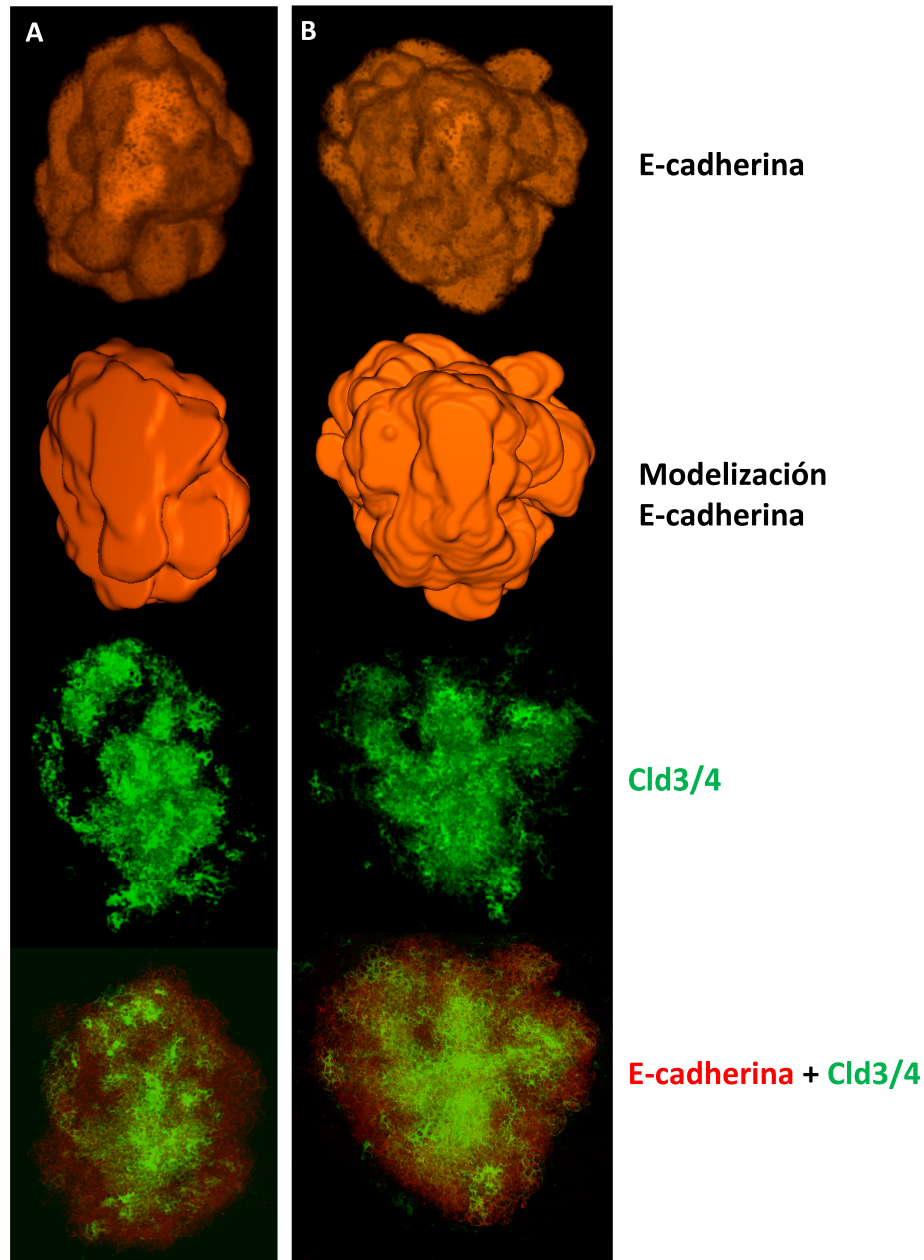


Figura 35. Reconstrucciones tridimensionales de lóbulos NSG de 15,5 dpc. A. Reconstrucciones tridimensionales de dos lóbulos tímicos NSG de 15,5 dpc. (A y B) obtenidas a partir de criosecciones seriadas de 10 μm , procesadas para inmunodetección de E-cadherina y Cld3/4. Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa una estructura lobulada, así como un marcaje de Cld3/4 (verde) central y continuo que ramifica hacia las lobulaciones.

A los 18,5 dpc. el lóbulo tímico comenzaba a presentar las características descritas en el timo postnatal (figs. 30 y siguientes). Era una estructura ya muy lobulada, claramente más que en timos *Nude* y, en el interior, se comenzaba a definir un lumen discontinuo similar pero no igual al observado en éste. Las diferencias fundamentales son: menor proporción de células Cld3/4+ y menor definición de lumen (ver figs. 19-20). El área Cld3/4+ era menor y sólo en algunos puntos de dicha estructura se concretaba un lumen (fig. 36 A, B). Por otra parte, el grado de estratificación o engrosamiento de la estructura era mayor. El estudio tridimensional (fig. 37) y un estudio en mayor profundidad del lumen (fig. 38 A-D) revelaban que, por una parte, la polarización de las células Cld3/4+ era más local, dando lugar a rosetas y pequeños lúmenes aislados o quistes con menos trazados/canales de polarización que conecten los lúmenes formados. Todo esto implica que a medida que las células Cld3/4+ polarizaban localmente se perdía la continuidad de la estructura Cld3/4+, ya que la frecuencia de estas células era menor, quedando como focos polarizados aislados o conectados por cordones celulares Cld3/4+ no polarizados (fig. 37, 38), definiendo ya lo que finalmente se observaba en la estructura postnatal.

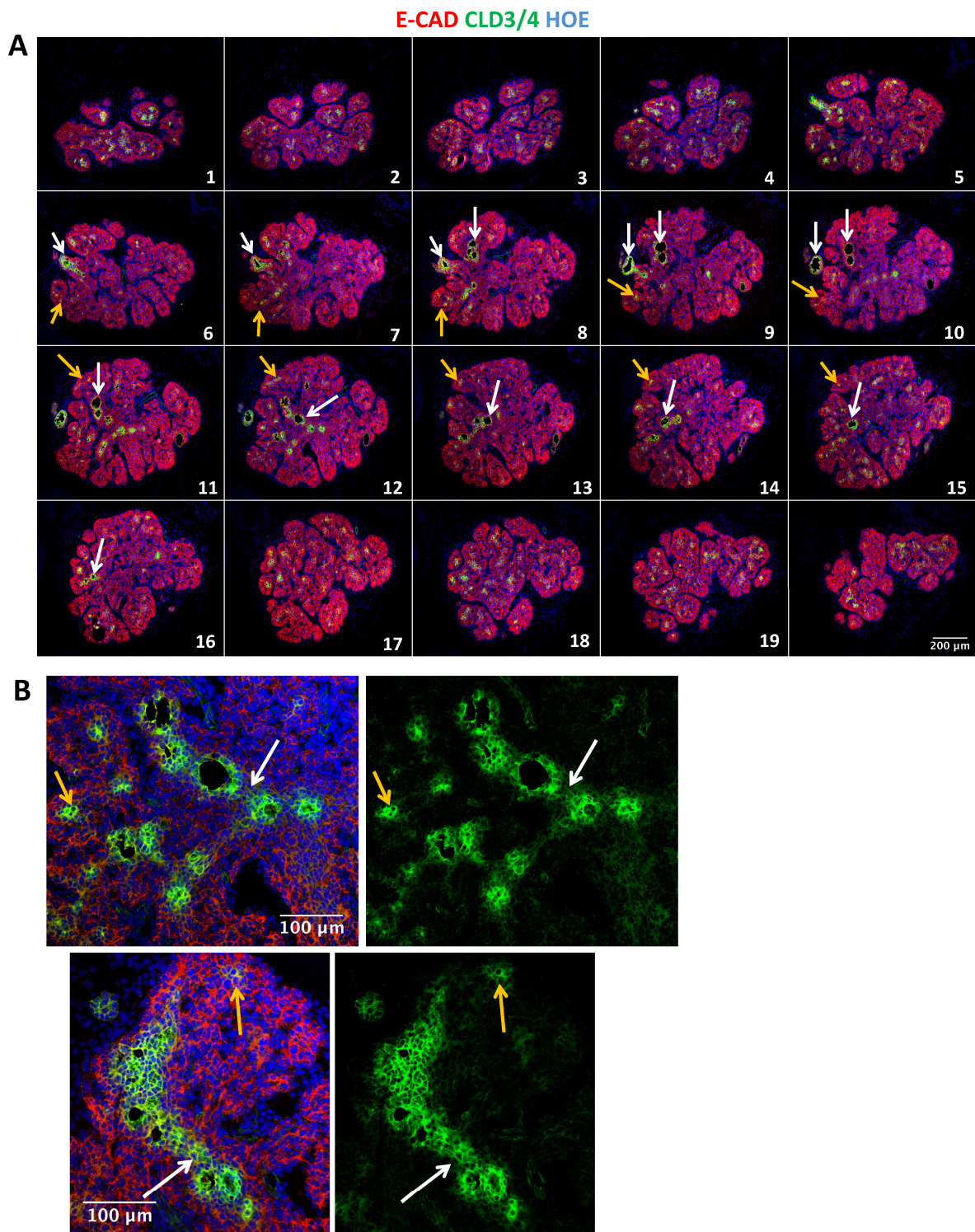


Figura 36. Los timos NSG de 18,5 dpc. muestran una estructura epitelial muy lobulada y estratificada, con lúmenes evidentes en la zona troncal y focos de polarización en la zona distal. A. Criosecciones seriadas de un timo NSG de 18,5 dpc., procesadas para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa un mayor grado de lobulación que en el estadio anterior, lúmenes Cld3/4+ en la zona troncal (flechas blancas) y focos de polarización en las zonas más distales (flechas amarillas). **B.** Zonas ampliadas de la figura A (objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM). Se observa la conexión de los lúmenes de la zona troncal mediante cordones celulares Cld3/4+ no polarizados (flechas blancas), así como focos de polarización que no llegan a formar claramente lúmenes (flechas amarillas).

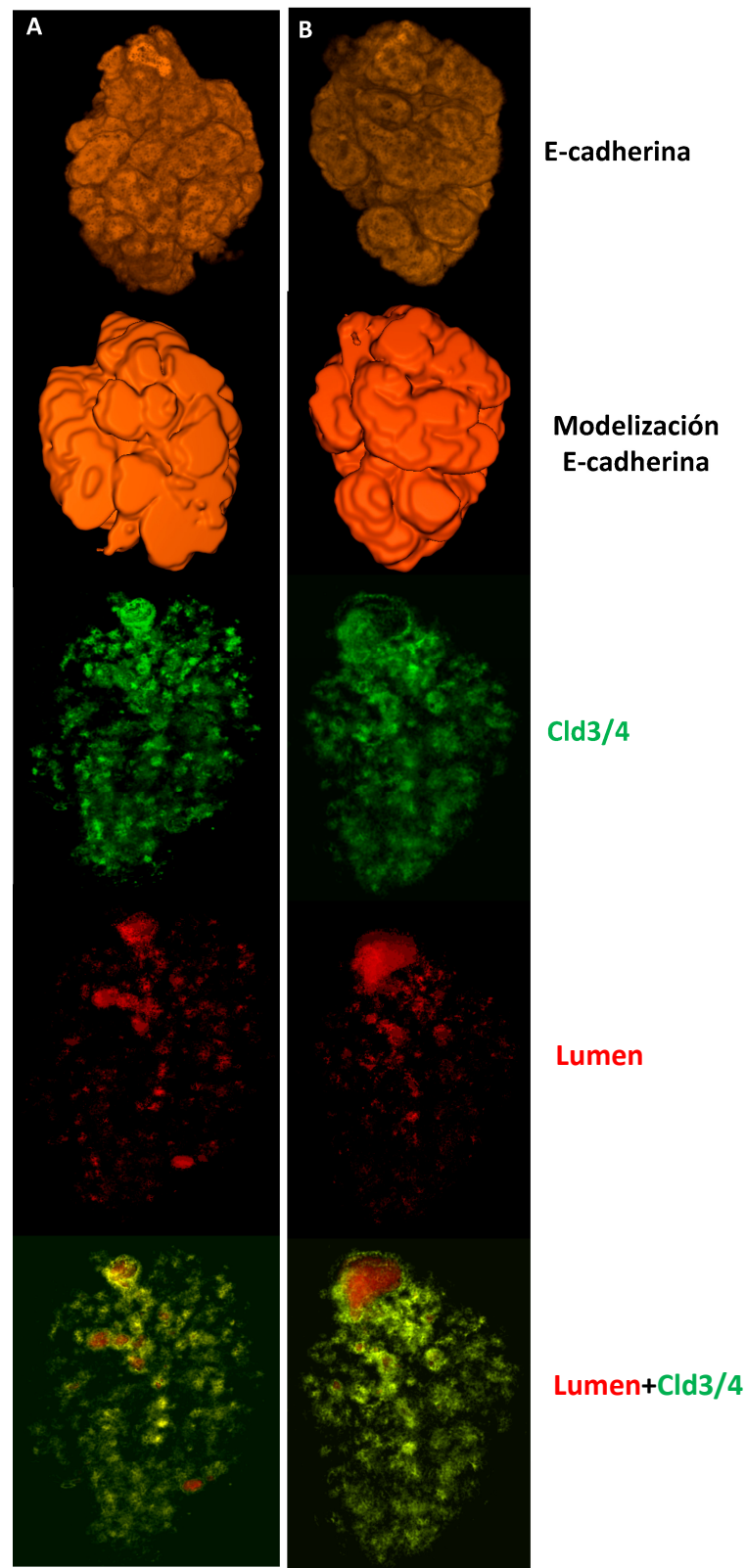


Figura 37. Reconstrucciones tridimensionales de timos NSG de 18,5 dpc. Reconstrucciones tridimensionales de dos lóbulos tímicos NSG de 18,5 dpc. (A y B) a partir de criosecciones seriadas de 10 μm procesadas para inmunodetección de E-cadherina y Cld3/4. Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa una estructura externa muy lobulada con lúmenes de distinto tamaño en la zona troncal y pequeños focos luminales en las más distales (rojo) todo englobado dentro de una estructura Cld3/4+ (verde) de apariencia ramificada pero discontinua.

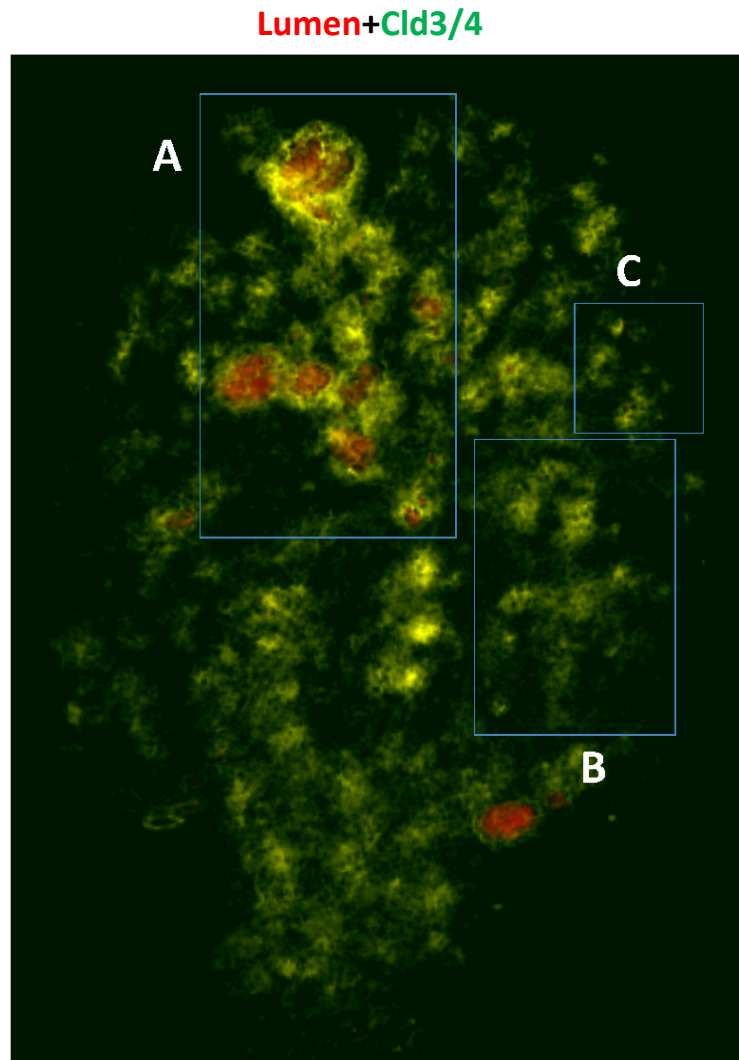


Figura 38 A

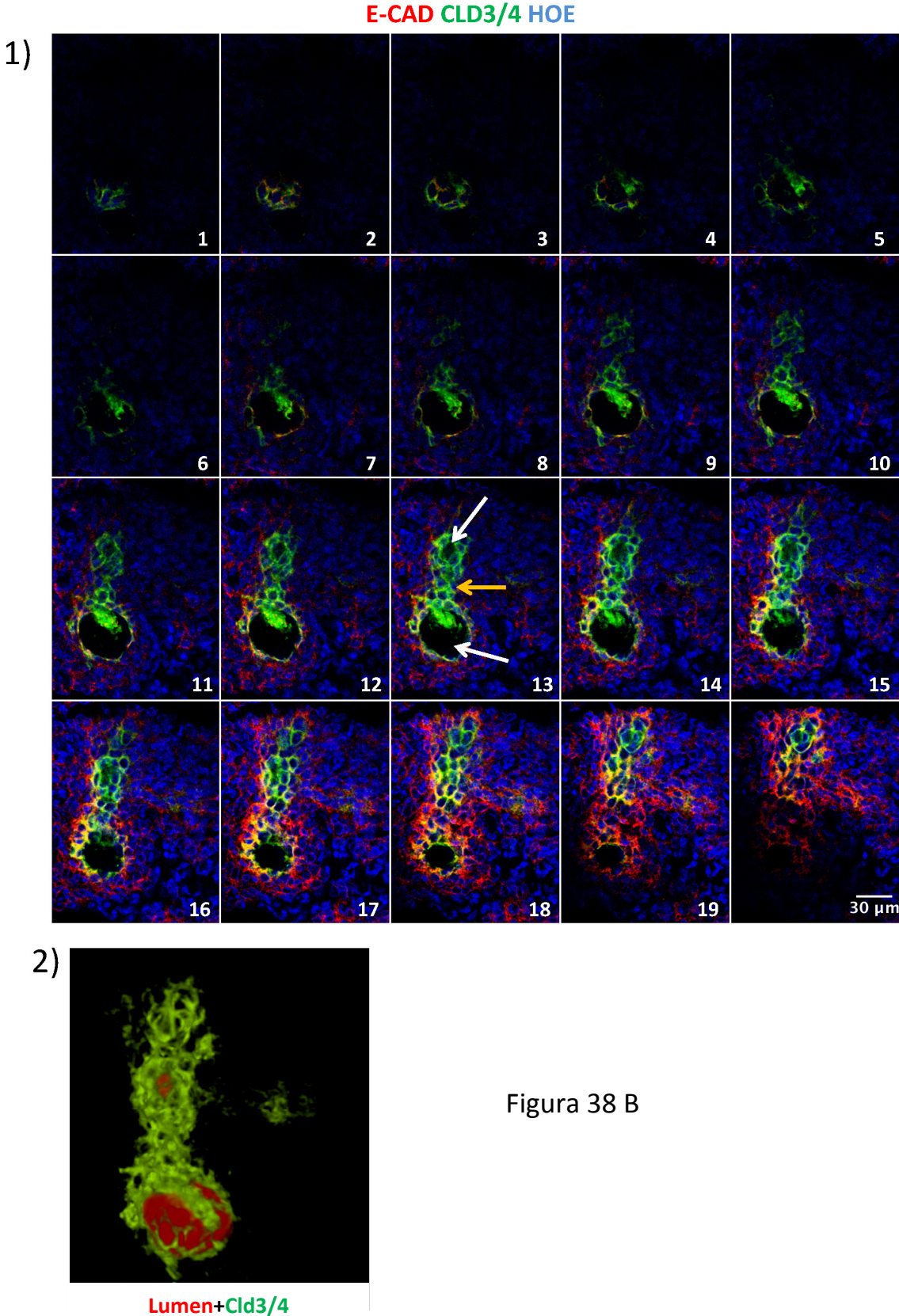
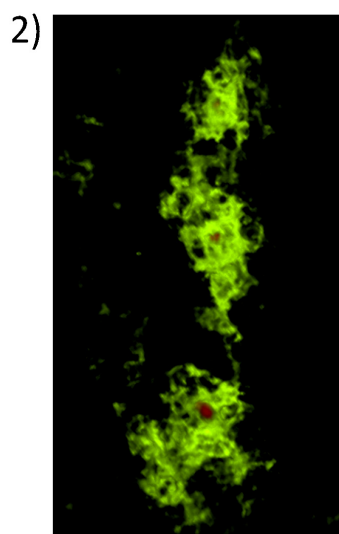
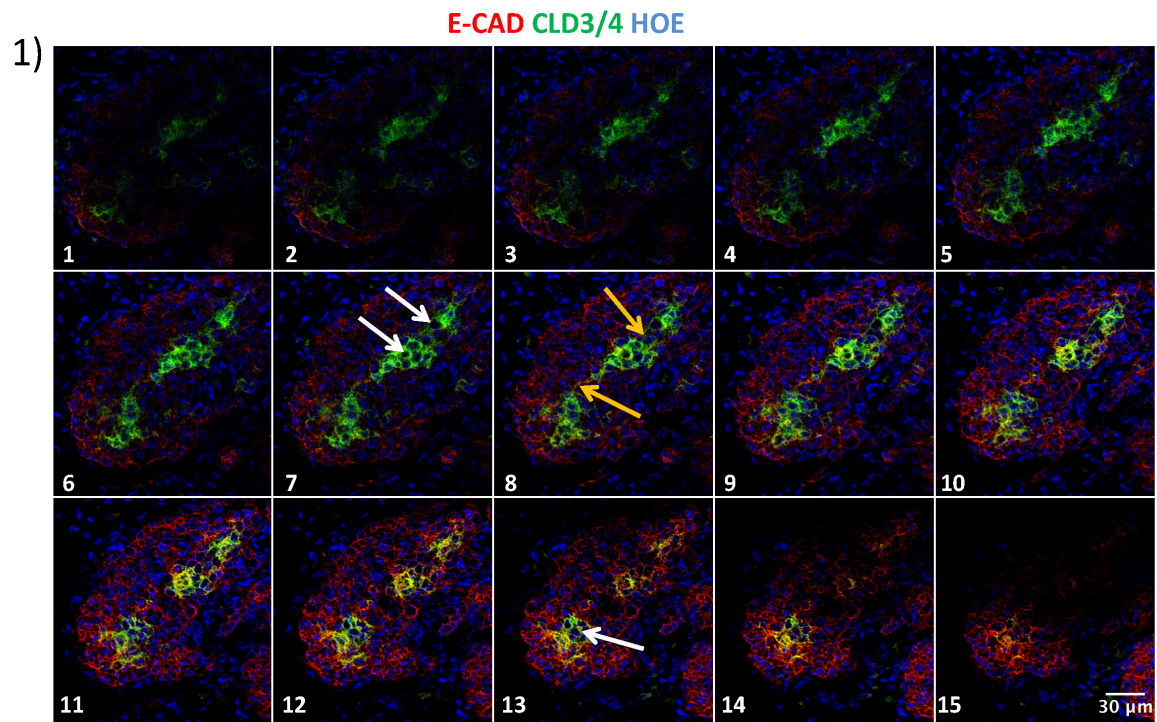


Figura 38 B



Lumen+CLD3/4

Figura 38 C

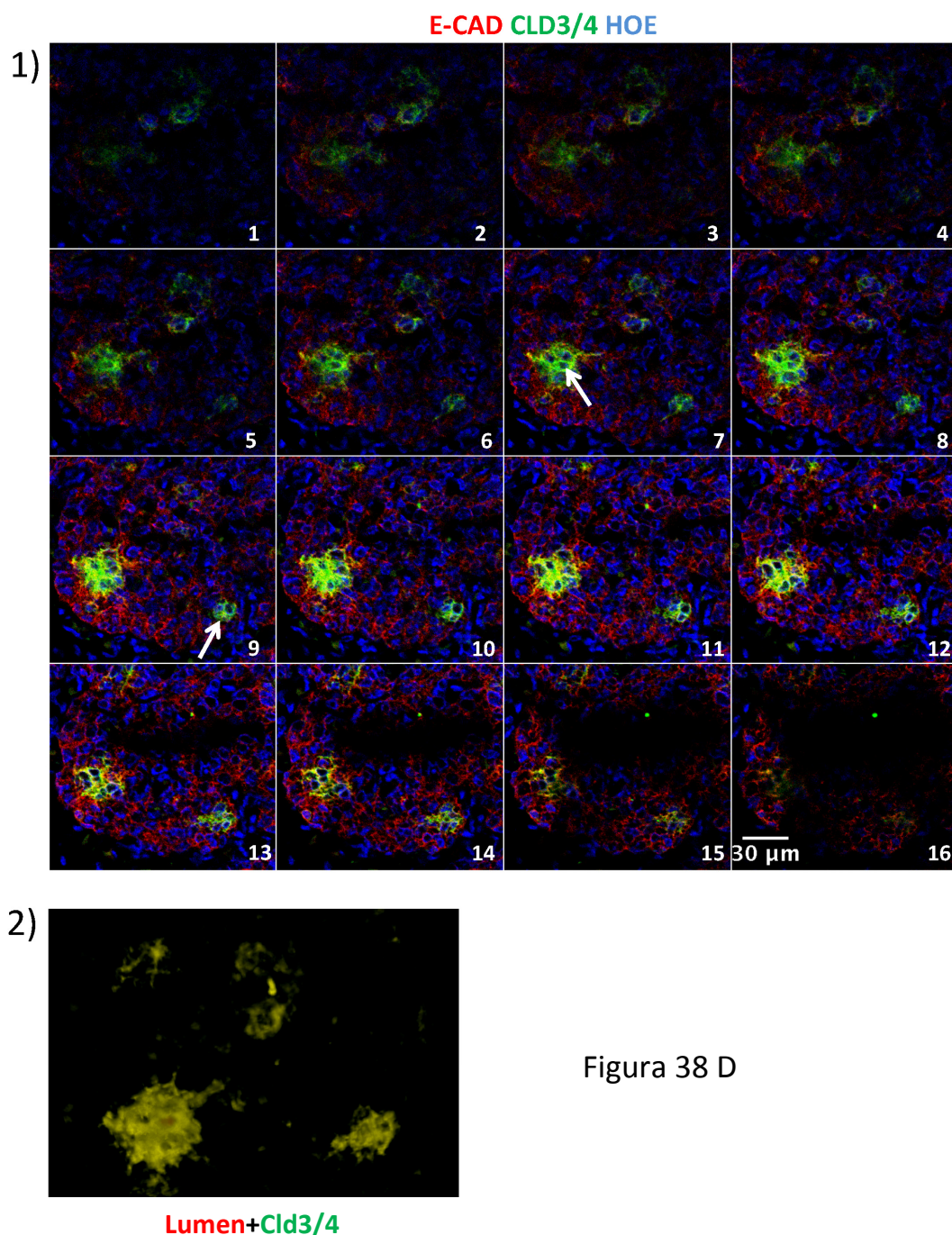


Figura 38 D

Figura 38. Estructura del lumen en timos NSG de 18,5 dpc. **A.** Reconstrucción tridimensional obtenida a partir de criosecciones seriadas de 10 μm procesadas para inmunodetección de Cld3/4 y escaneadas con un objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa en verde el marcaje de Cld3/4 y el lumen se resalta en rojo. Distinguimos tres zonas, una central con lúmenes más grandes (zona A) y otras dos más distales, una con microlúmenes que parecen estar incluidos en una región continua Cld3/4+ (zona B) y otra en los extremos de las lobulaciones donde hay microlúmenes que parecen estar aislados (zona C). **B. Los lúmenes centrales (zona A) de timos NSG de 18,5 dpc. están conectados entre sí por cordones celulares Cld3/4+.** La serie muestra secciones obtenidas al escanear en xyz con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM una zona central de una criosección de 120 μm , procesada para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul), con una separación de 0,6 μm entre cada sección (1) y el volumen generado a partir de ellas (2). Se observa que el marcaje de Cld3/4 (verde, flechas amarillas) poco polarizado conecta dos lúmenes (rojo, flechas blancas) aislados entre sí. **C. Los timos NSG de 18,5**

dpc. presentan microlúmenes conectados por estrechas regiones Cld3/4+ en sus zonas periféricas (zona B). La serie muestra secciones obtenidas al escanear en xyz con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM una zona distal de una criosección de 120µm, procesada para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul), con una separación de 0,6 µm entre cada sección **(1)** y su reconstrucción tridimensional **(2)**. Se observan microlúmenes (rojo, flechas blancas) conectados entre sí por células Cld3/4+ (verde, flechas amarillas). **D. Los microlúmenes y focos de polarización de los extremos de las lobulaciones (zona C) de timos NSG de 18,5 dpc. están aislados entre sí.** La serie muestra secciones obtenidas al escanear en xyz con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM una zona en el extremo de una lobulación de una criosección de 120µm, procesada para inmunodetección de E-cad (rojo), Cld3/4 (verde) y Hoechst (azul), con una separación de 0,6 µm entre cada sección **(1)** y su reconstrucción tridimensional **(2)**. Se observan grupos celulares que forman microlúmenes y rosetas (flechas) aislados entre sí.

A partir de este estadio la diferenciación de las células Cld3/4- a Cld3/4+ y el proceso de desestratificación que observábamos en el timo *Nude*, no tenía lugar. Por el contrario, el crecimiento del timo *NSG* redundaba en una mayor estratificación/engrosamiento de los lóbulos a partir de células Cld3/4-. Esto indica que, en presencia de FoxN1, a partir de un momento en torno a los 15,5 dpc., se producía tan sólo la polarización parcial y local, de forma discontinua, de las células Cld3/4+ diferenciadas en los primeros estadios; la subsiguiente regulación positiva de Cld3/4 en las capas intermedias, su diferenciación apical y su incorporación a la formación de lumen con la consiguiente restructuración/desestratificación del epitelio, que se observaba en el timo *Nude*, no tenía lugar (fig. 39). Sin embargo, sí se producía la lobulación de la estructura. Así pues, la expresión de FoxN1 presente en los timos *NSG* mantenía la lobulación de la estructura pero inhibía la diferenciación apical de sus células epiteliales, es decir, la regulación positiva de la expresión de Cld3/4, su polarización y la formación de lumen, mientras promovía o mantenía el crecimiento de las capas intermedias, lo que redundaba en un mayor engrosamiento de la masa epitelial que quedaba con la estructura típica de los lobulillos tímicos. Este mismo patrón de morfogénesis del timo, basado en los datos “in toto” y de reconstrucciones hasta ahora explicados, se repetía en los ratones *Ikaros* *-/-* (ver panel comparativo *NSG-Ikaros* en fig. 40).

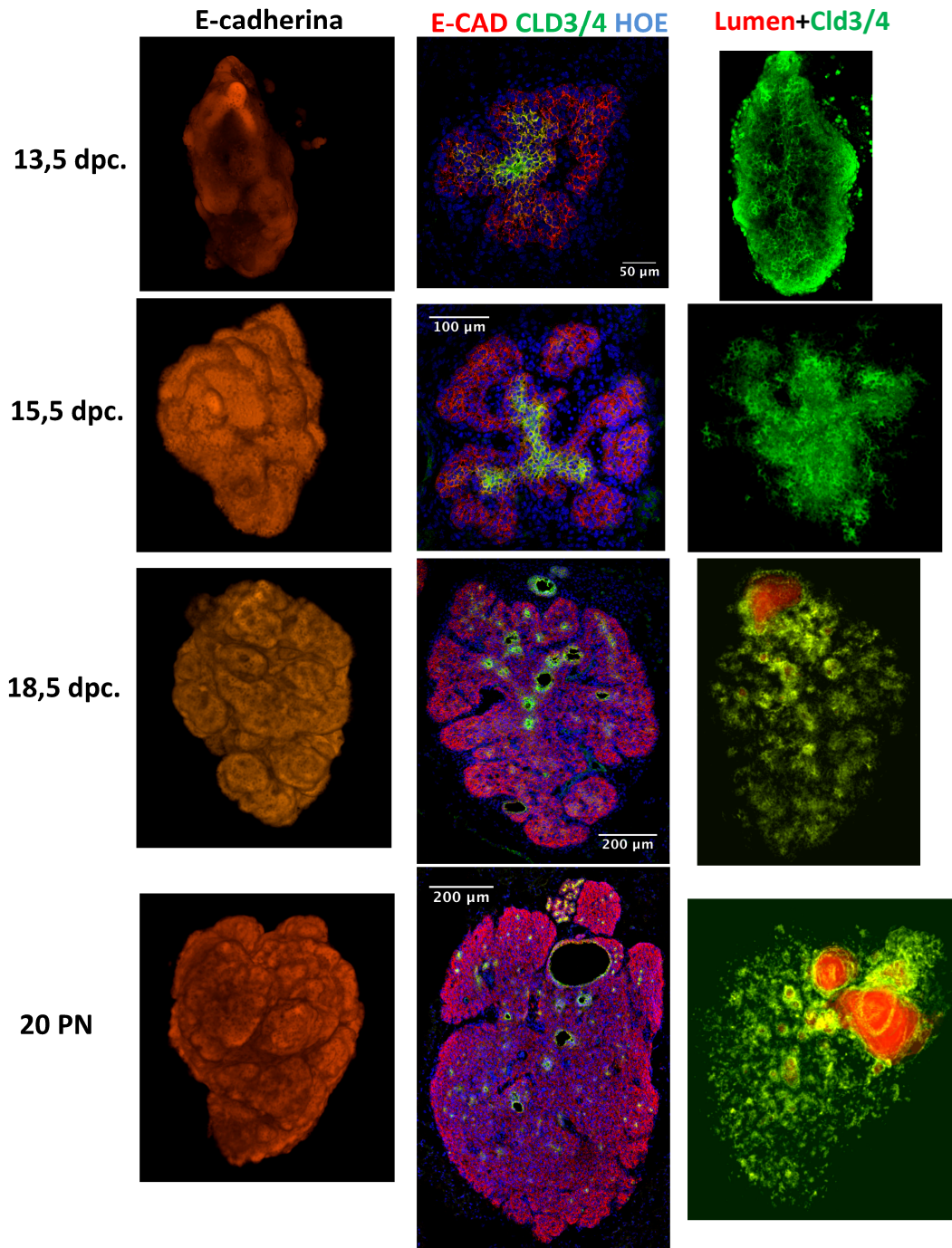


Figura 39. Evolución de la organización de los timos NSG durante la ontogenia. Panel resumen del desarrollo del timo NSG desde los estadios fetales más tempranos estudiados hasta el estadio postnatal (20PN). Hasta 15,5 dpc. se observa una estructura central Cld3/4+ continua, que a partir de este estadio se polariza a la vez que la estructura epitelial Cld3/4- crece sin que haya aparentemente más diferenciación de células Cld3/4- a Cld3/4+. Por tanto, las células Cld3/4+ definen finalmente lúmenes y focos de polarización aislados o puntualmente conectados entre sí por cordones de células Cld3/4+ más despolarizados en el interior de una estructura epitelial engrosada y muy lobulada.

Analizamos, igual que en el timo *Nude*, la expresión de los marcadores MTS10, K5, K8 y UEA a lo largo de la ontogenia de ratones *NSG* e *Ikaros* $-/-$. A pesar de la heterogeneidad en el grado de desarrollo entre individuos, debido a las diferencias de horas de gestación hasta la detección del tapón espermático, más evidentes en los primeros estadios, se observaba que el desarrollo morfogenético seguía el mismo patrón en ambos casos, resultando en un timo que, a los 3 días postnatal, presentaba esencialmente la misma estructura con las mismas características generales, presencia de los mismos lúmenes centrales y grandes quistes en las mismas posiciones, lo que indicaba, en líneas generales, un patrón morfogenético constante (fig. 40). Tanto en los timos *Ikaros* $-/-$ como en los *NSG*, se observaba que, desde los 13,5 dpc. hasta los 15,5 dpc. la expresión de estos marcadores coincidía esencialmente con lo descrito en el caso del timo *Nude*. K5 y MTS10 se expresaban en poblaciones asociadas a la población Cld3/4+ y, por tanto, a la formación de lumen en este caso incompleta (fig. 40). A partir de esta edad, la diferencia con el timo *Nude* consistía en la falta de formación de lumen y de desestratificación del epitelio, de manera que estos marcadores permanecían en esencia asociados a las regiones Cld3/4+ y circundantes a ésta formando un continuo ramificado. En el caso del timo *Ikaros* $-/-$, en torno a los 3 días postnatal, se produce su colonización por precursores linfoides de médula ósea, lo que conlleva el desarrollo de un timo histológicamente equivalente al timo *wt* (ver después), con regiones corticales y medulares bien definidas. La médula quedaba determinada a partir de las regiones Cld3/4+ y MTS10+ y la corteza a partir de las regiones adyacentes a éstas que no expresaban estos marcadores, aunque, a diferencia del timo *wt* adulto, en este caso la inmensa mayoría del epitelio era K5+K8+ (fig. 40). Este hecho sugería que el desarrollo de corteza y médula estaba fundamentado en la estructura histológica del timo alinfoide y que podría generarse a partir de su estructura postnatal. Por tanto, el timo alinfoide parece un modelo adecuado para identificar el patrón histológico sobre el que se fundamenta el desarrollo del timo *wt* en presencia de precursores linfoides.

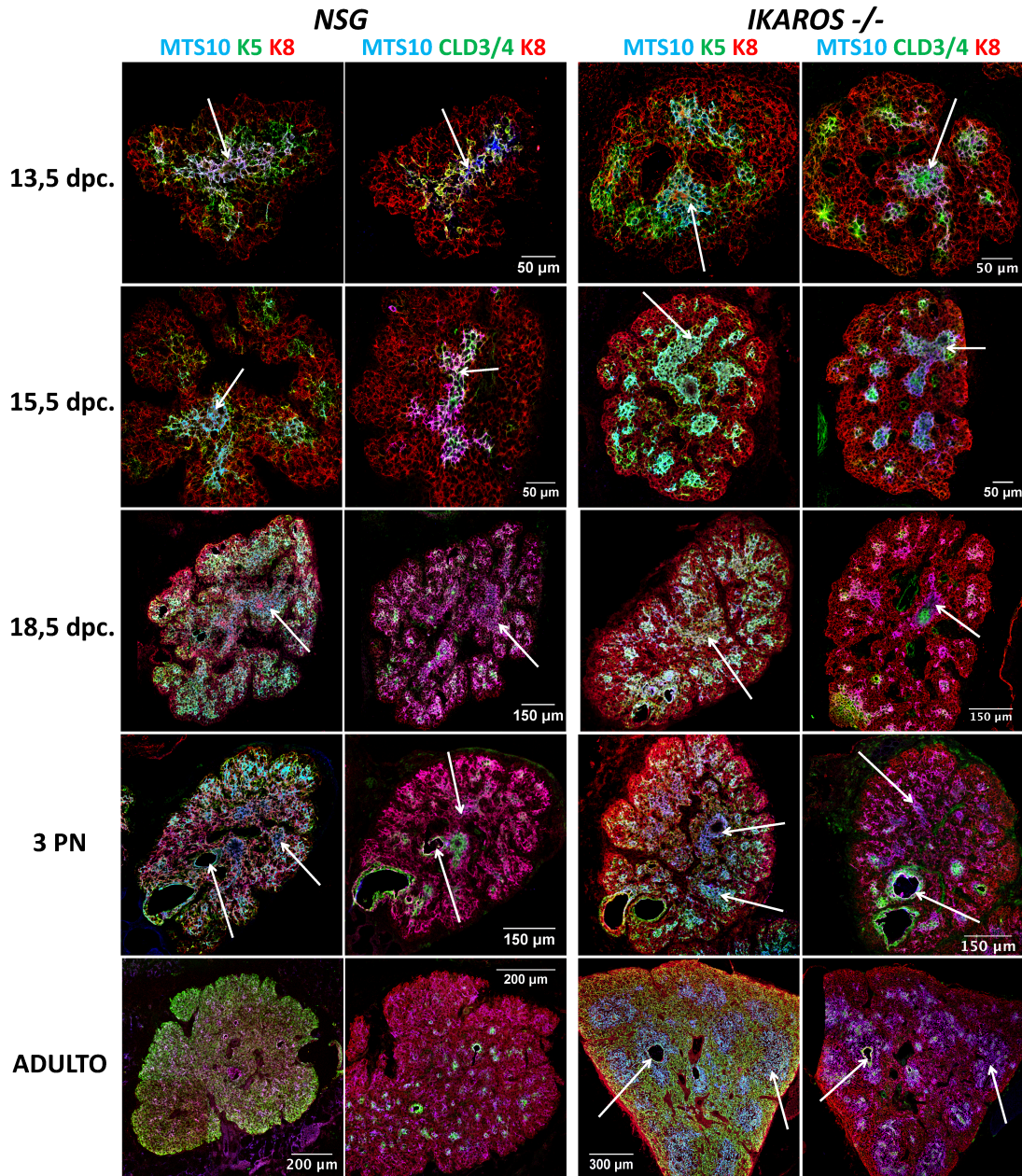


Figura 40. Panel comparativo de la evolución de distintos marcadores epiteliales diferenciales de epitelio tímico a lo largo del desarrollo fetal y postnatal de timos NSG e Ikaros $-/-$. Crio-secciones de timos de distintas edades de ratones NSG e Ikaros $-/-$, procesados para inmunodetección de K8 (rojo), MTS10 (azul) y K5 o Cld3/4 (verde). Objetivos HC PL APO CS 10.0x0.40 UV y HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se puede observar que ambos genotipos muestran una evolución similar de dichos marcadores, estando hasta 15,5 dpc. las células MTS10+ y K5+ asociadas a la población central Cld3/4+ y quedando a partir de 18,5 dpc. asociados a dichas regiones y a las circundantes a éstas (flechas) formando un continuo ramificado. A 3 días postnatal se observan estructuras muy similares. A partir de este estadio los timos Ikaros $-/-$ son colonizados por linfocitos. En timos Ikaros $-/-$ adultos se observa una diferenciación de los compartimentos cortical y medular, donde la médula queda definida por la expresión de Cld3/4 y MTS10 (flechas), similar a la observada en el timo wt (ver fig. 77). Los timos adultos NSG no muestran dicha compartimentalización.

Sobre este patrón histológico definido por marcadores relacionados con la diferenciación corteza/médula pero sin implicación funcional conocida, analizamos si la presencia de FoxN1 en ausencia de linfocitos es suficiente para que el epitelio tímico adquiriera las características funcionales propias de ambos compartimentos. Una de tales características funcionales del epitelio es su capacidad para el procesamiento y presentación de antígenos como una célula presentadora profesional, aunque con algunas características específicas del epitelio tímico, como son el procesamiento de antígenos provenientes de autofagia en vez de fagocitosis, o el procesamiento alternativo especializado en selección positiva en el caso de la corteza y la producción de autoantígenos en el de la médula. Una de las moléculas analizada a este respecto fue **MHC-II**, una glicoproteína de membrana que pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, implicada en la presentación de antígenos a linfocitos T. Su expresión en el epitelio cortical se ha asociado con la presencia de timocitos DN3 en diferenciación (*Shakib y cols., 2009*). Otra de las moléculas objeto de análisis en este sentido fue **DEC205**, una proteína integral de membrana tipo C-lectina, receptor de carbohidratos e implicada en endocitosis, que reconoce ligandos expresados durante la apoptosis y necrosis de múltiples tipos celulares. Está implicada en el procesamiento y presentación antigénicos, es expresada por células dendríticas y cTECs adultas y parece ser el primer marcador asociado al compromiso con el linaje cortical que se expresa independientemente de la presencia de precursores linfoides (*Shakib y cols., 2009*), aunque recientemente se ha visto que las células medulares en algún momento han expresado DEC205 y que células fetales DEC205+ tienen capacidad de diferenciar también a células medulares (*Baik y cols., 2013*). Así mismo, analizamos la expresión del factor de transcripción **AIRE**, un regulador autoinmune que es expresado por un subset de mTECs y participa en la expresión promiscua de antígenos tisulares propios y en la generación de tolerancia frente a ellos (*Heino y cols., 1999; Ferguson y cols., 2008*). Finalmente, analizamos la expresión de **CD80**, una molécula coactivadora relacionada con la funcionalidad medular (*Williams y cols., 2014*). Por tanto, analizamos mediante inmunomarcaje la expresión de MHC-II, DEC205, CD80 y AIRE en cortes histológicos de timos alinfoides *NSG* e *Ikaros* *-/-* en distintos estadios de la ontogenia. Es importante aclarar que en el caso de los ratones

NSG, al pertenecer a la cepa *NOD*, presentan moléculas MHC-II de tipo “I-A equivalent”, por lo que en este caso se utilizó el anticuerpo (RT1B) específico para dichas moléculas. Como sucedía con los marcadores “no funcionales”, la aparición y localización de los marcadores funcionales estudiados fue similar en ambos casos hasta la colonización linfoide postnatal de los timos *Ikaros* $-/-$ (fig. 41). Todos los timos estudiados expresaban MHC-II y DEC205, localizados, en los primeros estadíos, en las zonas más centrales y extendiéndose su expresión a partir de 18,5 dpc. hacia el resto del epitelio, pero siempre de forma excluyente con las células Cld3/4+. A partir de 3 días postnatal, cuando comenzaba la colonización linfoide del timo *Ikaros* $-/-$, las células medulares Cld3/4+ de estos timos regulaban positivamente la expresión de MHC-II, produciéndose, finalmente, una compartimentalización corteza/médula con una corteza DEC205+ y MHCII+ y una médula MTS10+MHCII+DEC205- en la que se encontraban las células Cld3/4+ (figs. 40, 41), similar a los timos *wt* (ver después).

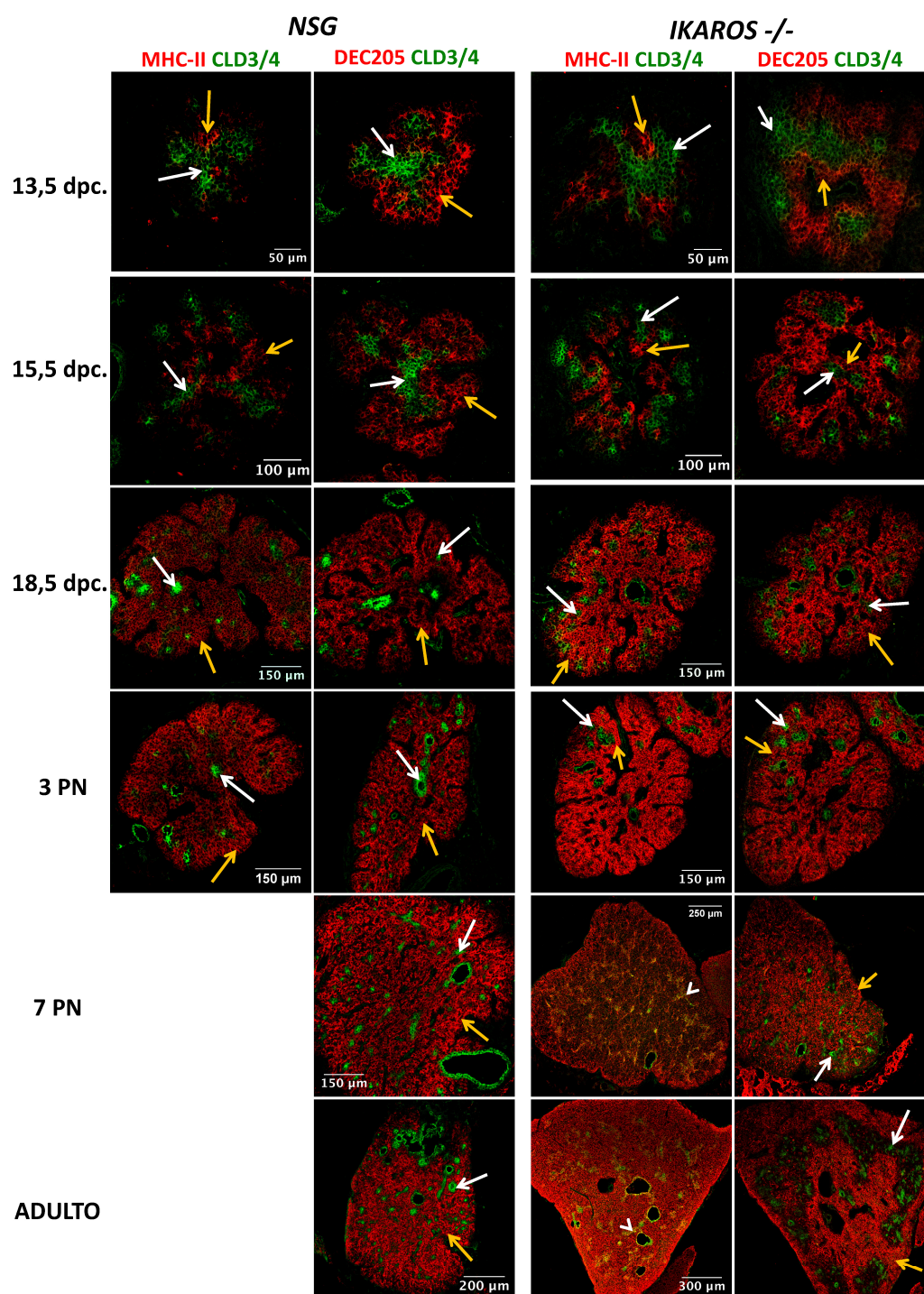


Figura 41. Panel comparativo de la expresión de distintos marcadores relacionados con función en el epitelio tímico a lo largo del desarrollo fetal y postnatal de timos NSG e *Ikaros* $-/-$. Criosecciones de timos de distintas edades de ratones NSG e *Ikaros* $-/-$, procesados para inmunodetección de MHC-II (rojo) y *Cld3/4* (verde) o DEC205 (rojo) y *Cld3/4* (verde). Objetivos HC PL APO CS 10.0x0.40 UV y HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa que la aparición y la evolución durante la ontogenia del timo de las expresiones tanto de MHC-II como de DEC205 (flechas amarillas) en las TECs es similar en ambos genotipos y excluyente con la población *Cld3/4*+ (flechas blancas), hasta el estadio postnatal, donde los timos *Ikaros* $-/-$ son colonizados por los linfocitos. En éstos, las células *Cld3/4*+ adquieren la expresión de MHC-II (cabezas de flechas) y una compartimentalización corteza/médula donde las flechas amarillas señalan células corticales DEC205+*Cld3/4*- y las flechas blancas y cabezas de flecha células medulares *Cld3/4*+DEC205- y *Cld3/4*+MHCII+, respectivamente.

Decidimos analizar en detalle en base a estos marcadores el desarrollo del timo *NSG* como modelo alinfoide. A los 13,5 dpc. el primordio tímico *NSG* resultó ser muy parecido histológicamente al observado en ratones *Nude*, aunque con algunas diferencias: presentaba una lobulación y ramificación incipiente donde las células Cld3/4+ expresaban en su mayoría MTS10. La expresión de K5 coincidía con la de Cld3/4, pero ocupaba un área algo mayor que ésta y que la de MTS10+ (fig. 42 A-D). Por su parte, DEC205 se expresaba en la mayoría de la región externa a la región central Cld3/4+ y de forma excluyente con la misma. En esta misma zona MHC-II se expresaba en algunas regiones centrales adyacentes al marcaje de Cld3/4, observándose una ligera expresión en zonas más distales. No había expresión de AIRE y se observaban células CD45+ situadas en las trabéculas o rodeando el timo (fig. 43 A-C).

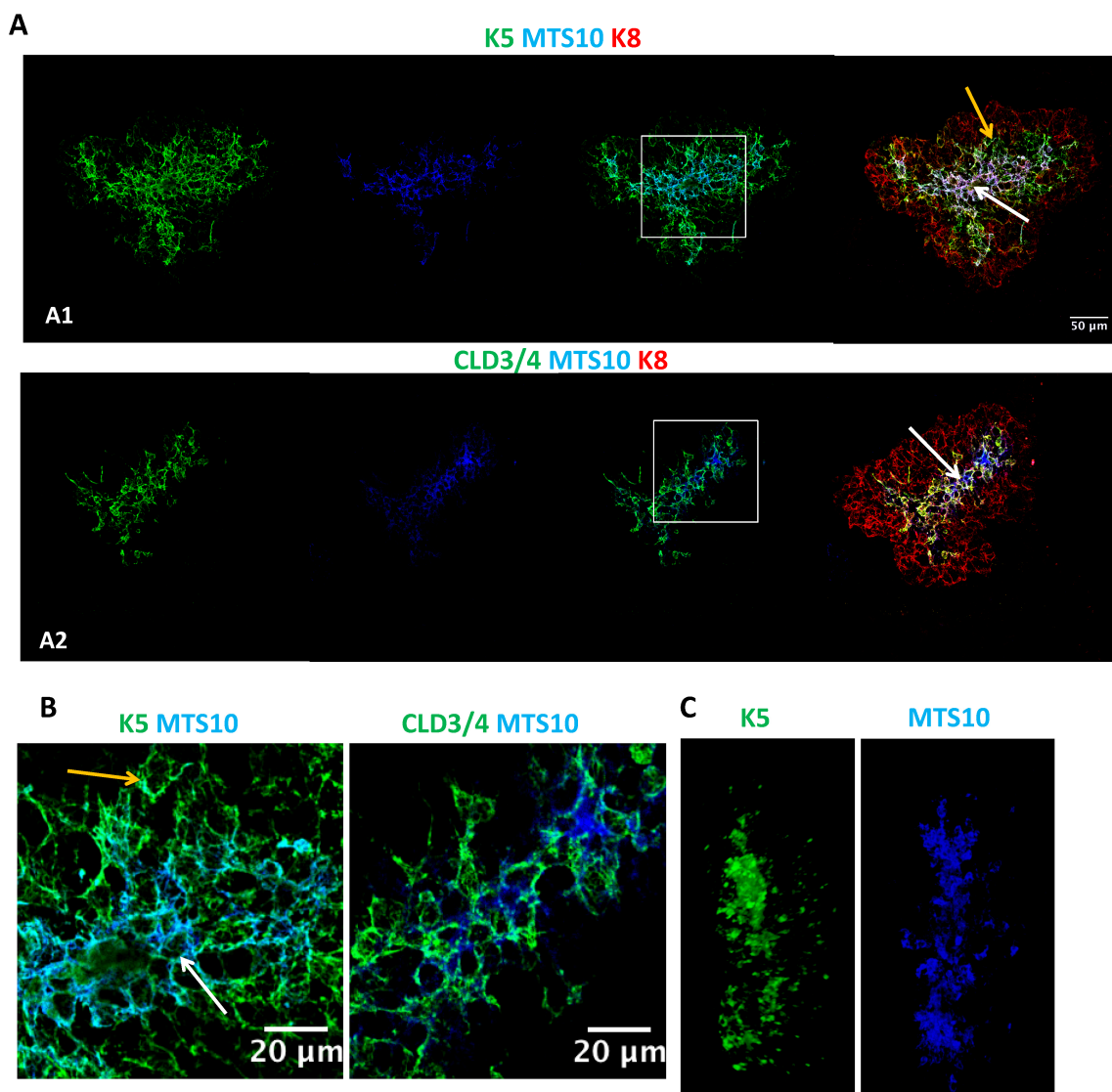


Figura 42 A, B, C

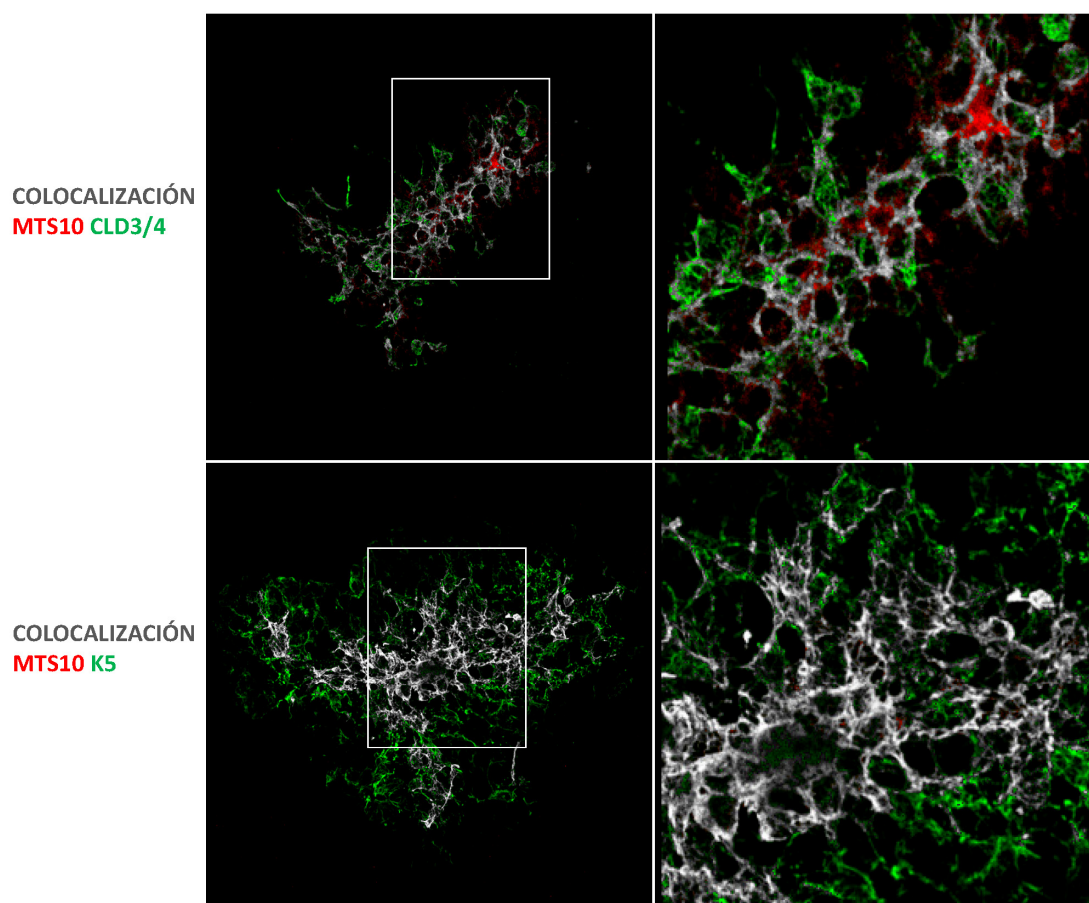


Figura 42 D

Figura 42. En timos NSG de 13,5 dpc. *Cld3/4* y *MTS10* se expresan en la zona central de la región central más amplia *K5+*. **A.** Inmunodetección de *K5* (verde), *MTS10* (azul) y *K8* (rojo) (**A1**), y *Cld3/4* (verde), *MTS10* (azul) y *K8* (rojo) (**A2**) sobre criosecciones seriadas de 10 μm (objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM). **B.** Ampliaciones de las zonas enmarcadas en A. Las flechas blancas señalan la población central *K5+MTS10+Cld3/4+* y las flechas amarillas la población periférica a ésta, algo más extensa *K5+MTS10-Cld3/4-*, siendo las capas más externas del epitelio tímico *K8+*. **C.** Volumen generado a partir de lóbulos tímicos NSG de 13,5 dpc. procesados para inmunodetección in toto de *K5* (verde) y *MTS10* (azul) (objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV). Separación de 1 μm entre secciones. *K5* y *MTS10* muestran un marcaje ramificado en la zona central del lóbulo. **D.** Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización (blanco) de *MTS10* (rojo) con *Cld3/4* o *K5* (verde). Se observa que la población *MTS10+* supone la mayor parte de la *Cld3/4+* y está englobada en la zona central *K5+*, de forma que todas las células *Cld3/4+* y *MTS10+* son también *K5+*.

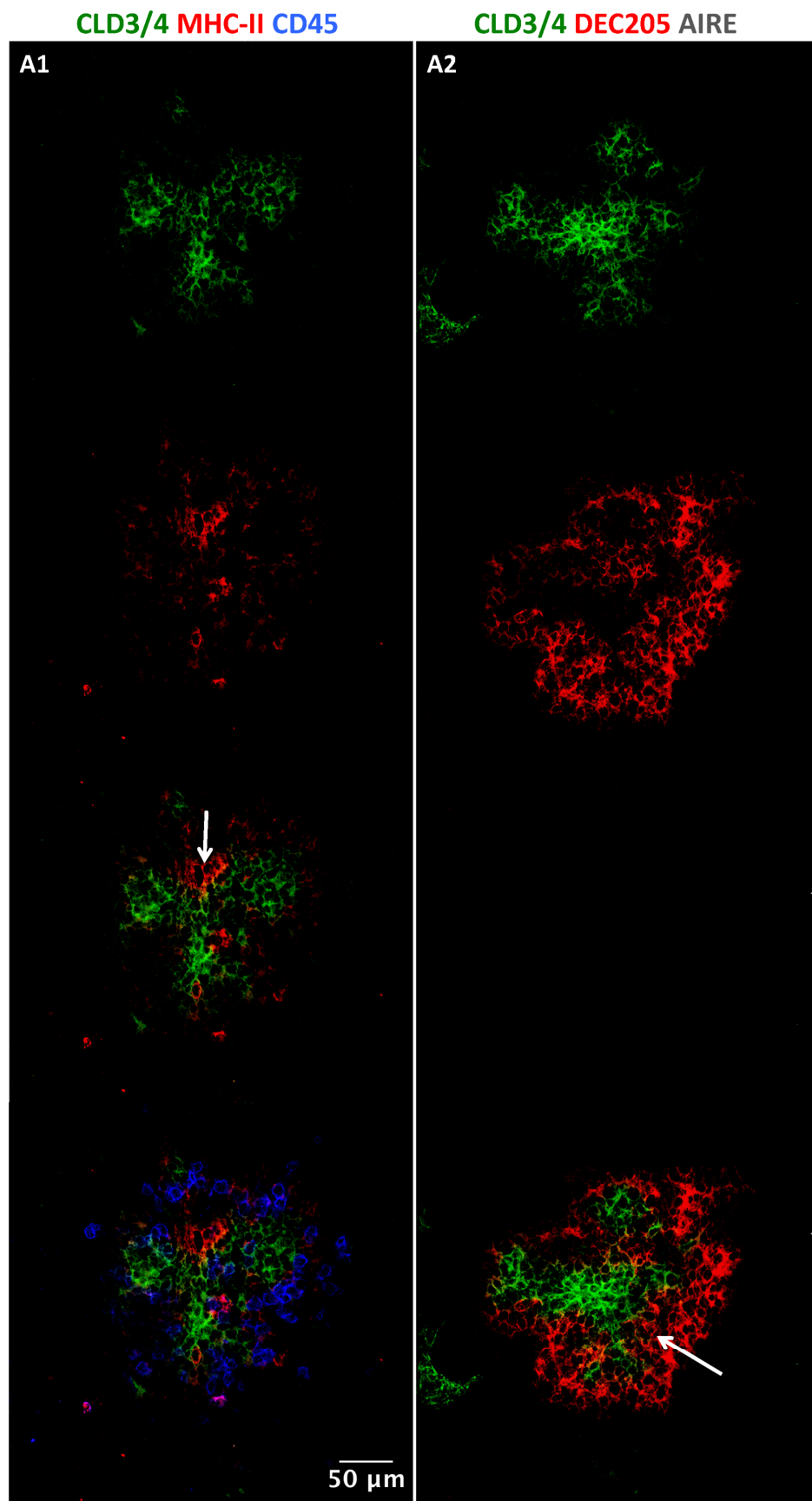


Figura 43 A

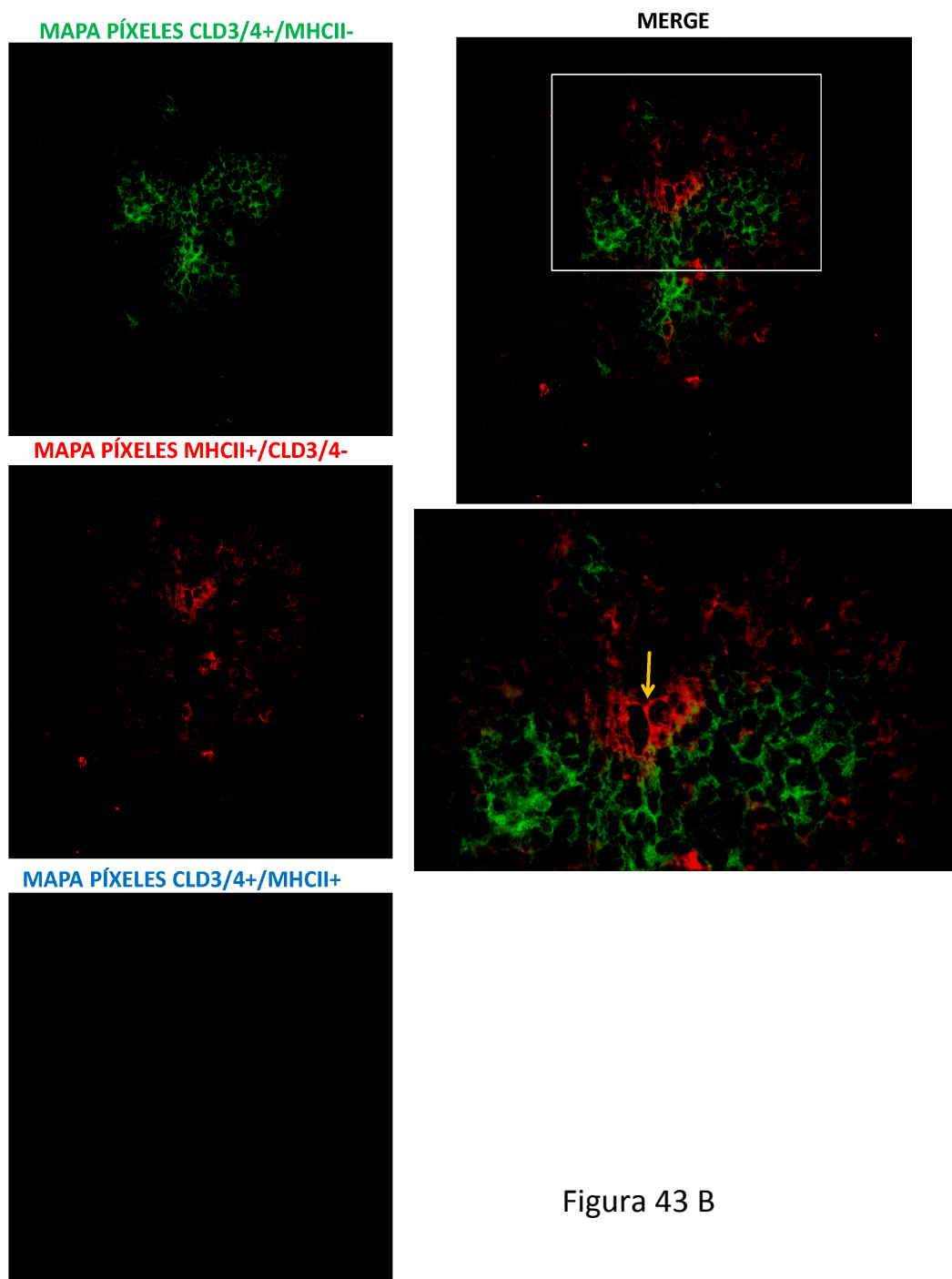


Figura 43 B

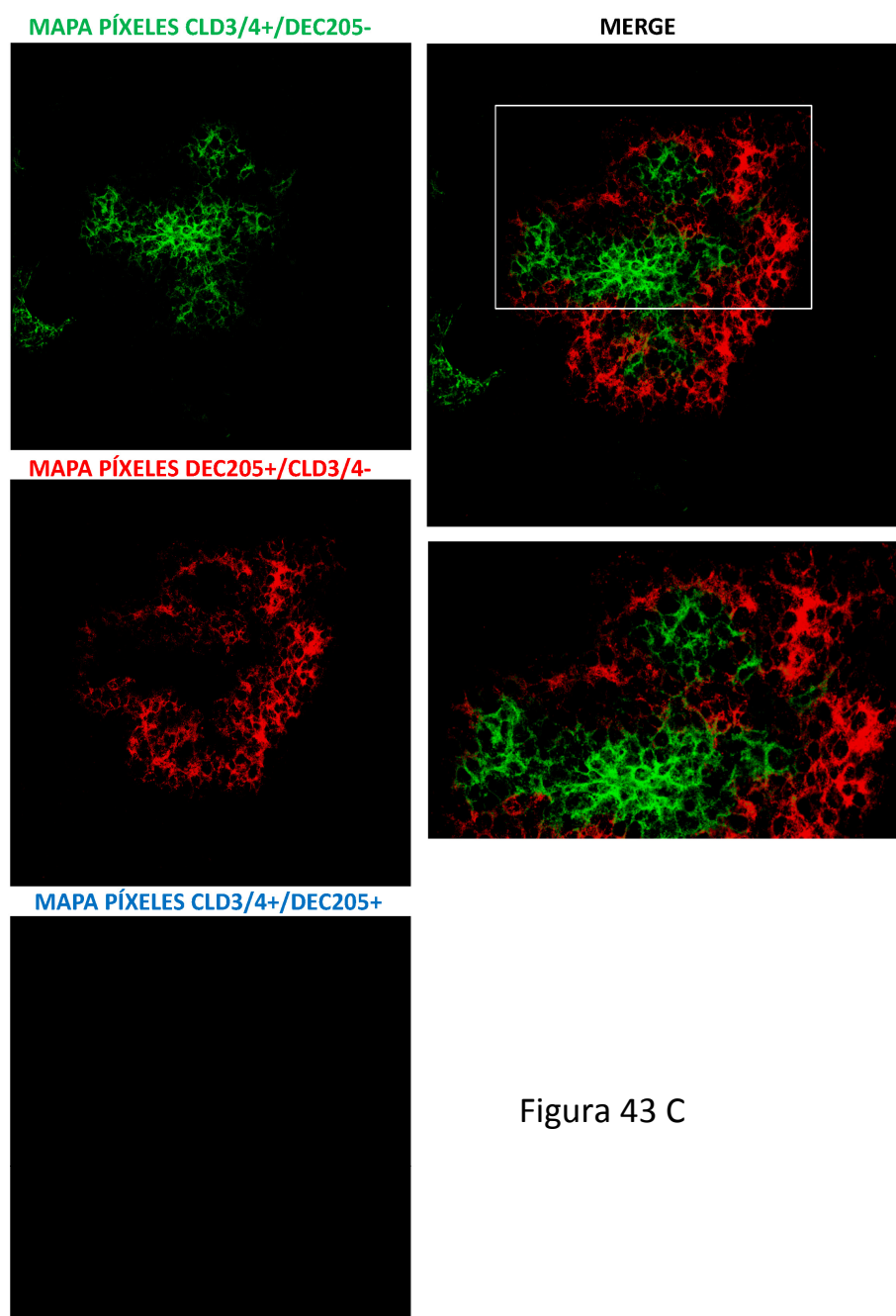


Figura 43 C

Figura 43. En timos NSG de 13,5 dpc. no hay expresión de AIRE pero MHC-II y DEC205 se expresan en células situadas en la región central de forma excluyente con la población Cld3/4+. **A.** Criosecciones de timos de 13,5 dpc. NSG procesadas para inmunodetección de Cld3/4 (verde), MHC-II (rojo) y CD45 (azul) (**A1**) o Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y AIRE (ausente, blanco) (**A2**). Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Hay células CD45+ rodeando el timo y no se observa expresión de AIRE. Las flechas señalan células circundantes a la región Cld3/4+ que expresan MHC-II y DEC205, suponiendo la población DEC205+ un área más extensa que la MHCII+. **B.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (verde) y MHCII+/Cld3/4- (rojo) y la población doble positiva para ambos (ausente, azul), así como una superposición de las tres poblaciones y un detalle ampliado (zona enmarcada). MHC-II (flechas amarillas) se expresa en algunas células de la población Cld3/4- y especialmente alrededor de ésta en la zona central del timo. **C.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/DEC205- (verde) y DEC205+/Cld3/4- (rojo) y la población doble positiva para ambos (ausente, azul), así como una superposición de las tres poblaciones y un detalle ampliado (zona enmarcada). La poblaciones Cld3/4+ y DEC205+ son excluyentes entre sí.

A 15,5 dpc. este mismo patrón se mantenía, con un mayor grado de ramificación de la zona central Cld3/4+K5+MTS10+. En las zonas distales se regulaba positivamente la expresión de K5 y, en algunos casos, la de Cld3/4 pero no la de MTS10, lo que sugería que existía una secuencia de diferenciación donde las células primero regulaban la expresión de K5, luego la de Cld3/4 y, por último, la de MTS10. En las zonas más troncales algunas de las células Cld3/4+ regulaban positivamente la expresión de UEA (fig. 44 A-C). Al igual que en el estadio anterior no observamos expresión de AIRE. La población DEC205+ ocupaba toda la región externa Cld3/4- con menos intensidad en la región subcapsular. La población MHC-II+ suponía un área algo mayor que en el estadio anterior aunque la molécula aún no se expresaba en las zonas más distales (fig. 45 A-C).

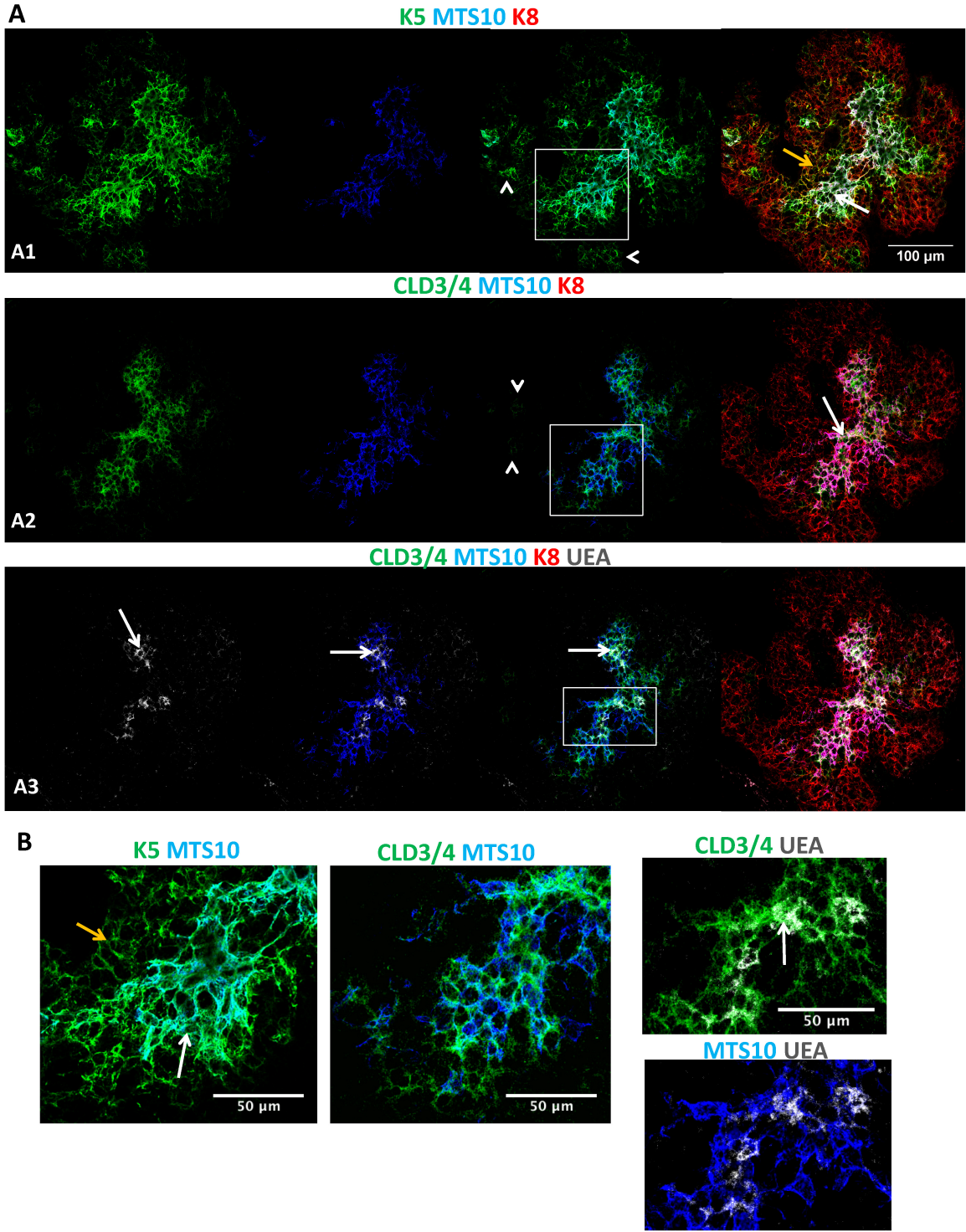


Figura 44 A, B

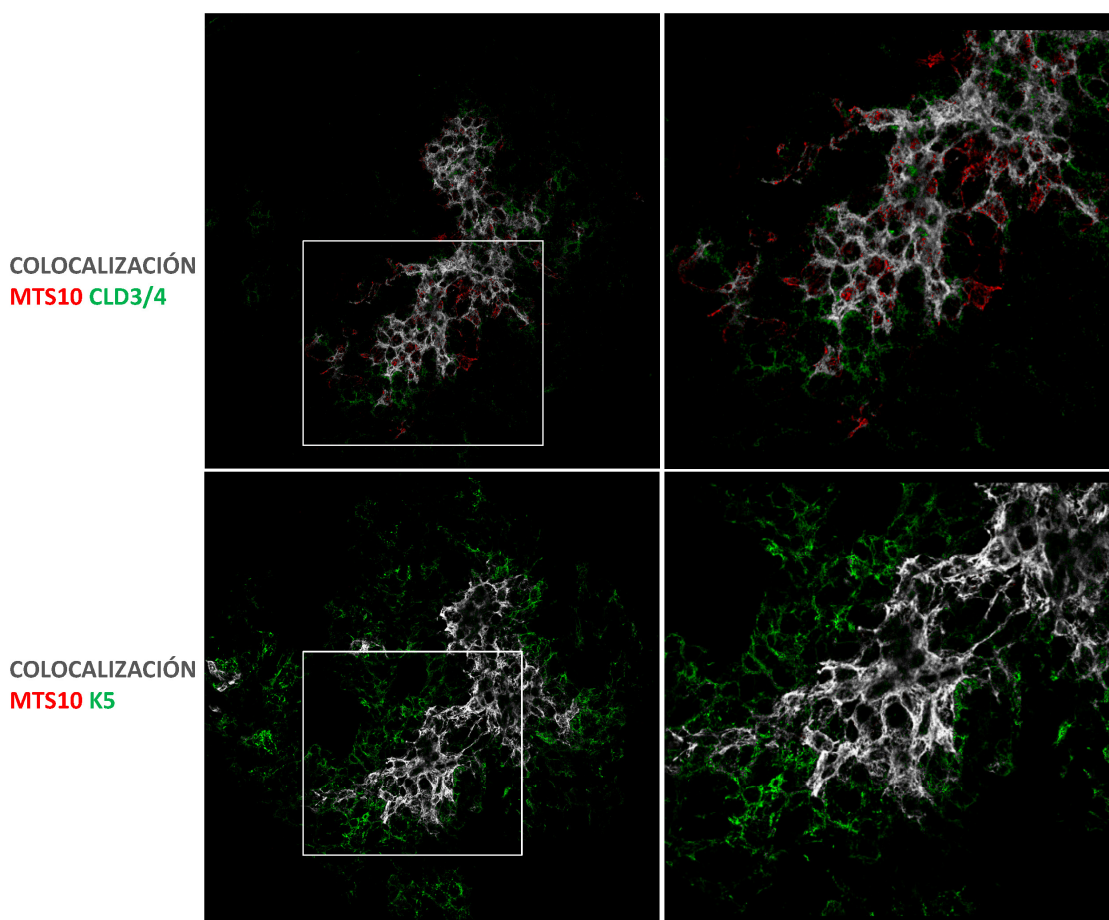


Figura 44 C

Figura 44. En timos de 15,5 dpc. NSG, MTS10 y Cld3/4 se expresan con un patrón ramificado en la zona central de la región más amplia K5+, donde algunas de las células Cld3/4+ expresan UEA. **A.** Criosecciones seriadas de 10 μ m de un lóbulo tímico de 15,5 dpc. NSG, procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A1**), o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A2**) y UEA (blanco) (**A3**). Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Las cabezas de flecha señalan células distales K5+ o Cld3/4+ pero MTS10-. **B.** Detalles de las zonas enmarcadas en A. Las flechas blancas señalan la población central K5+Cld3/4+MTS10+ que puntualmente expresa UEA y las amarillas la población K5+Cld3/4-MTS10- algo más extensa. Las capas más basales del primordio epitelial son K8 simples positivas.. **C.** Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización de MTS10 (rojo) con Cld3/4 o K5 (verde). Se observa que Cld3/4 y MTS10 tienen un marcaje bastante coincidente en la zona central del marcaje para K5, de forma que todas las células Cld3/4+ y MTS10+ expresan también K5.

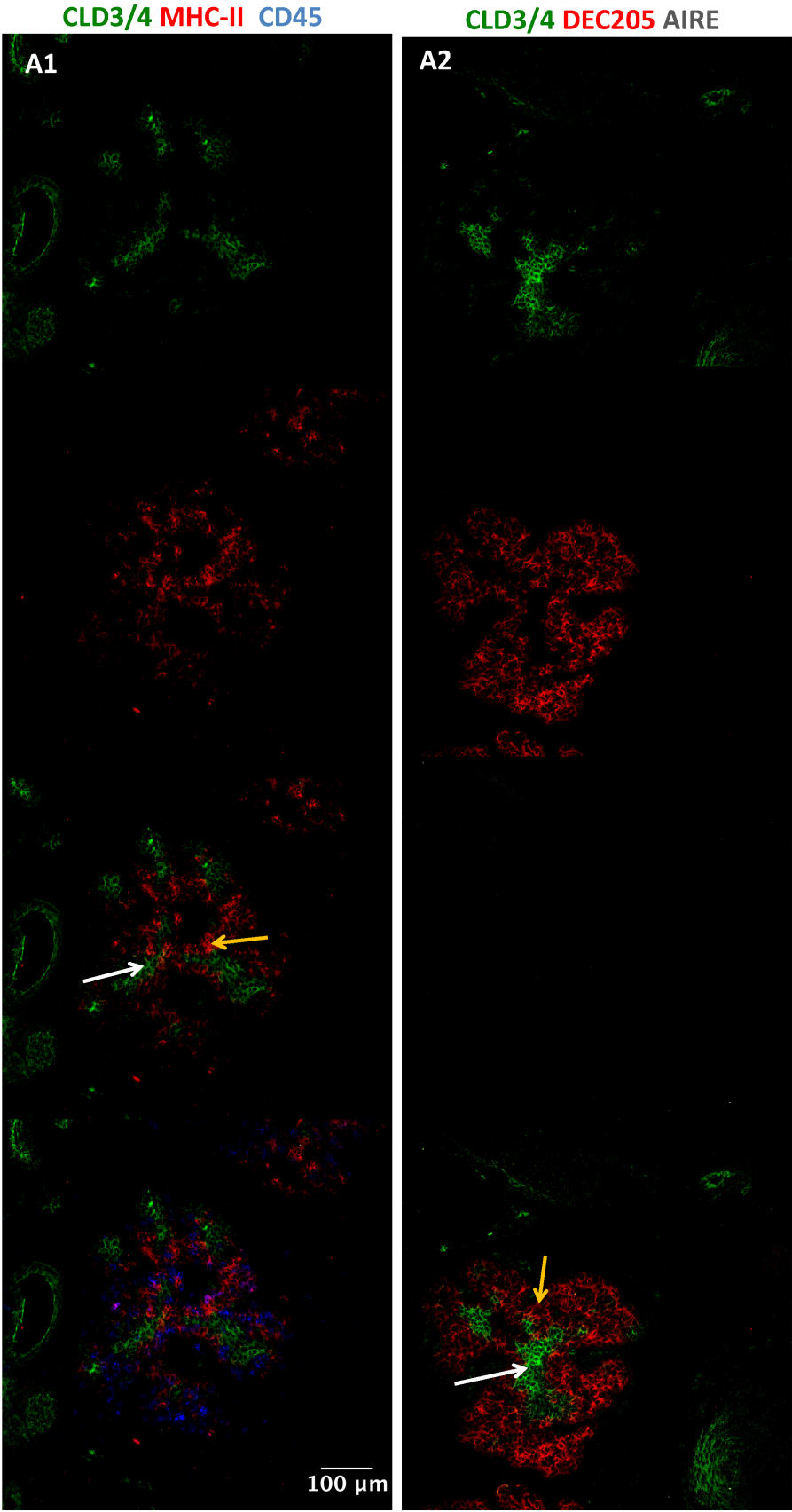
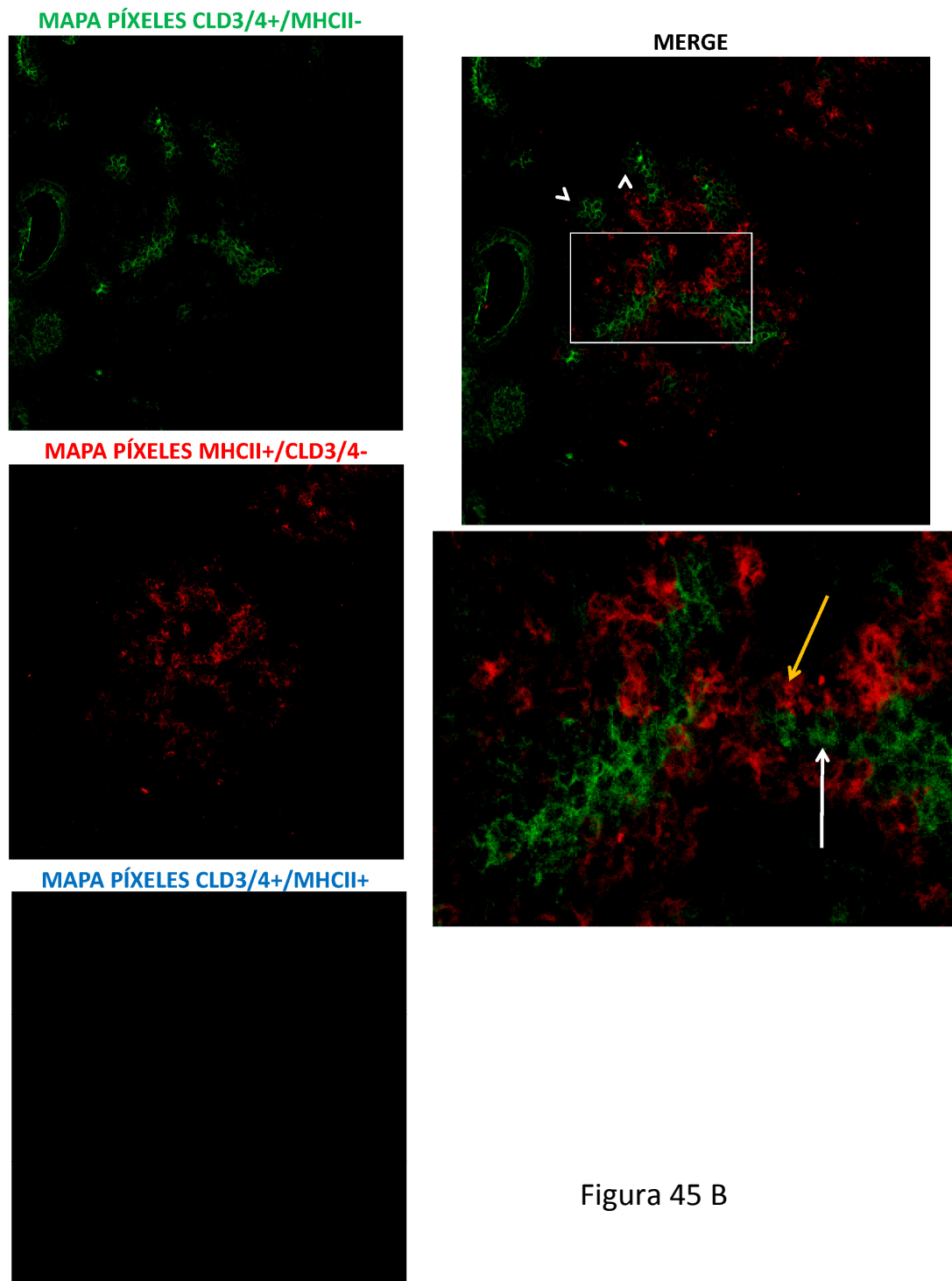


Figura 45 A



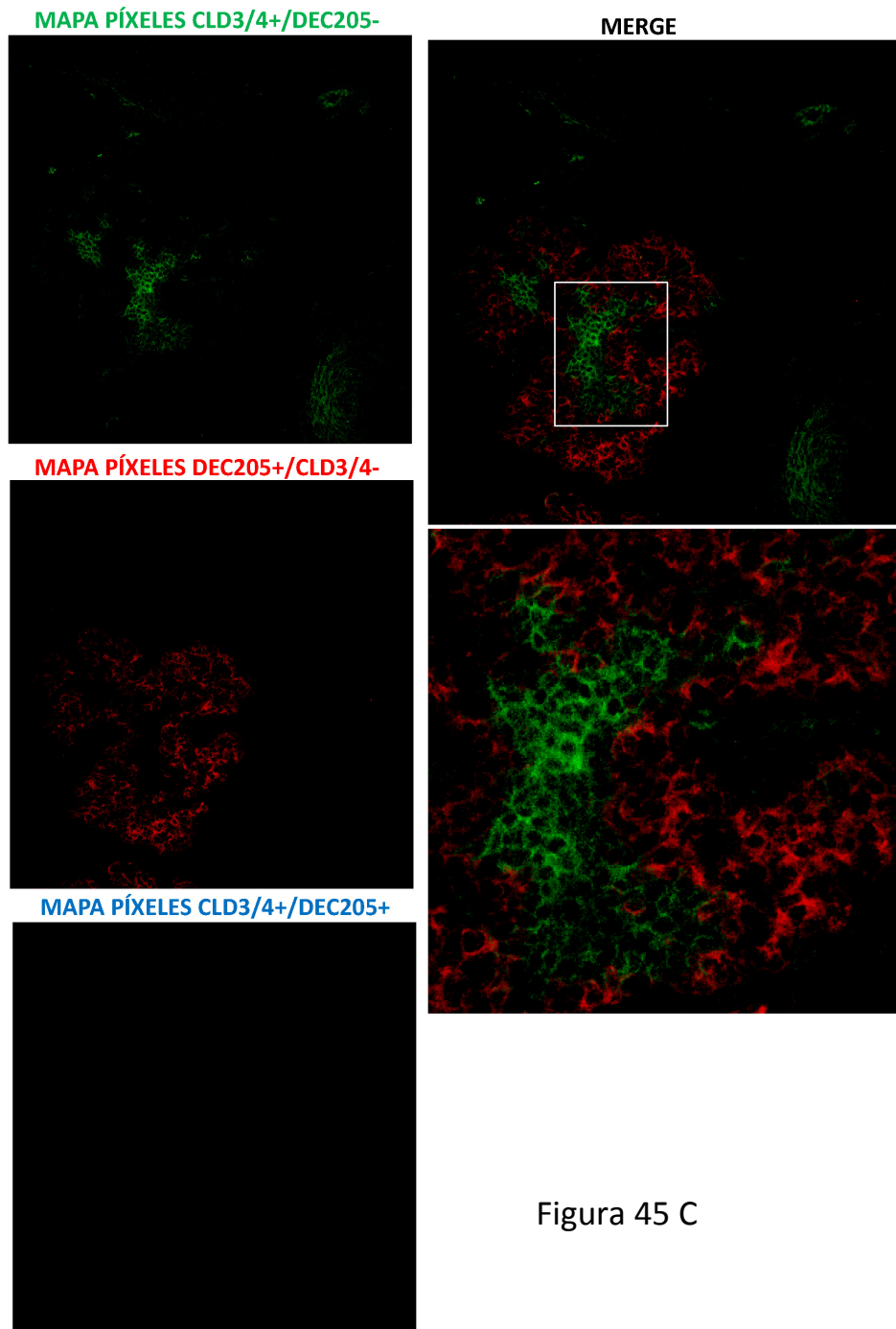


Figura 45 C

Figura 45. La expresión de MHC-II y DEC205 en timos de 15,5 dpc. NSG es excluyente con la población Cld3/4+ y AIRE continua sin expresarse. A. Inmunodetección de Cld3/4 (verde), MHC-II (rojo) y CD45 (azul) (A1) o Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y AIRE (ausente, blanco) (A2) sobre criosecciones (objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM). MHC-II y DEC205 (flechas amarillas) se expresan en células situadas alrededor del marcaje central ramificado definido por Cld3/4 (flechas blancas), siendo más amplia la población DEC205+ que la MHC-II+. No se detectó expresión de AIRE. **B.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (verde) y MHCII+/Cld3/4- (rojo), así como la población doble positiva para ambos (ausente, azul), una superposición de las tres poblaciones y un detalle ampliado (zona enmarcada). La población MHC-II+ (flecha amarilla) es excluyente con la población Cld3/4+ (flecha blanca). Las zonas distales no expresan MHC-II (cabezas de flecha). **C.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/DEC205- (verde) y DEC205+/Cld3/4- (rojo), así como la población doble positiva para ambos (ausente, azul), una superposición de las tres poblaciones y un detalle (zona enmarcada). La población DEC205+ constituye la mayor parte de la población Cld3/4-.

A los 18,5 dpc. se producía una evolución de estos marcadores similar, pero no estrictamente igual, a lo observado en los timos *Nude*, ya que en este caso no se concluía la formación de lumen. A esta edad distinguimos, al igual que en el timo *Nude*, dos zonas: una central, comparable a la zona troncal pluriestratificada escamosa del timo *Nude*, y otra distal en los extremos de las lobulaciones. El lóbulo ha crecido y ramificado, y en el centro de las lobulaciones la expresión de K5 y MTS10 definía un continuo ramificado que incluía o englobaba los focos y estructuras lumbinales Cld3/4+. Al igual que en el estadio anterior, UEA se expresaba más en las células Cld3/4+ más troncales. A esta edad la población MTS10+ suponía una proporción muy alta de la población K5+, aunque observábamos algunas células K5+MTS10- (fig. 46 A, B). Esta estructura es similar a la estructura del timo *Nude* de 16-17 dpc. pero más lobulada. En este caso las células Cld3/4+ ya no suponían toda la población MTS10+ (fig. 46), lo que indicaba que la expresión de FoxN1, además de inhibir la polarización y la formación de lumen, inhibía la regulación positiva de la expresión de Cld3/4 como ya se ha descrito, pero no la de otras proteínas asociadas con la diferenciación apical como K5 o MTS10. A esta edad observábamos células CD45+, algunas fuera del timo, situadas en las trabéculas y otras dispersas en su interior, pero no detectamos expresión de AIRE (fig. 47A). Un inmunomarcaje de las células CD45+ en timos de 17-18 dpc. *Ikaros* ^{-/-}, cuyo desarrollo como hemos visto era igual, en términos generales, al de los timos *NSG*, reveló que estas células CD45+ expresaban CD11c en su membrana, por lo que podrían tratarse de células dendríticas y no de linfocitos T (no mostrado). La expresión de DEC205 se extendía por toda la región Cld3/4-, a excepción de la zona subcapsular más externa, y la de MHC-II, en vez de permanecer localizada en la zona central del timo, suponía ya a esta edad casi la totalidad del mismo, por lo que la mayor parte del epitelio era MHCII+DEC205+, excepto las regiones Cld3/4+ que, como en estadios anteriores, no expresaban ninguno de estos marcadores, y la zona subcapsular más externa, que era MHCII+DEC205-/lo (fig. 47 B-C).

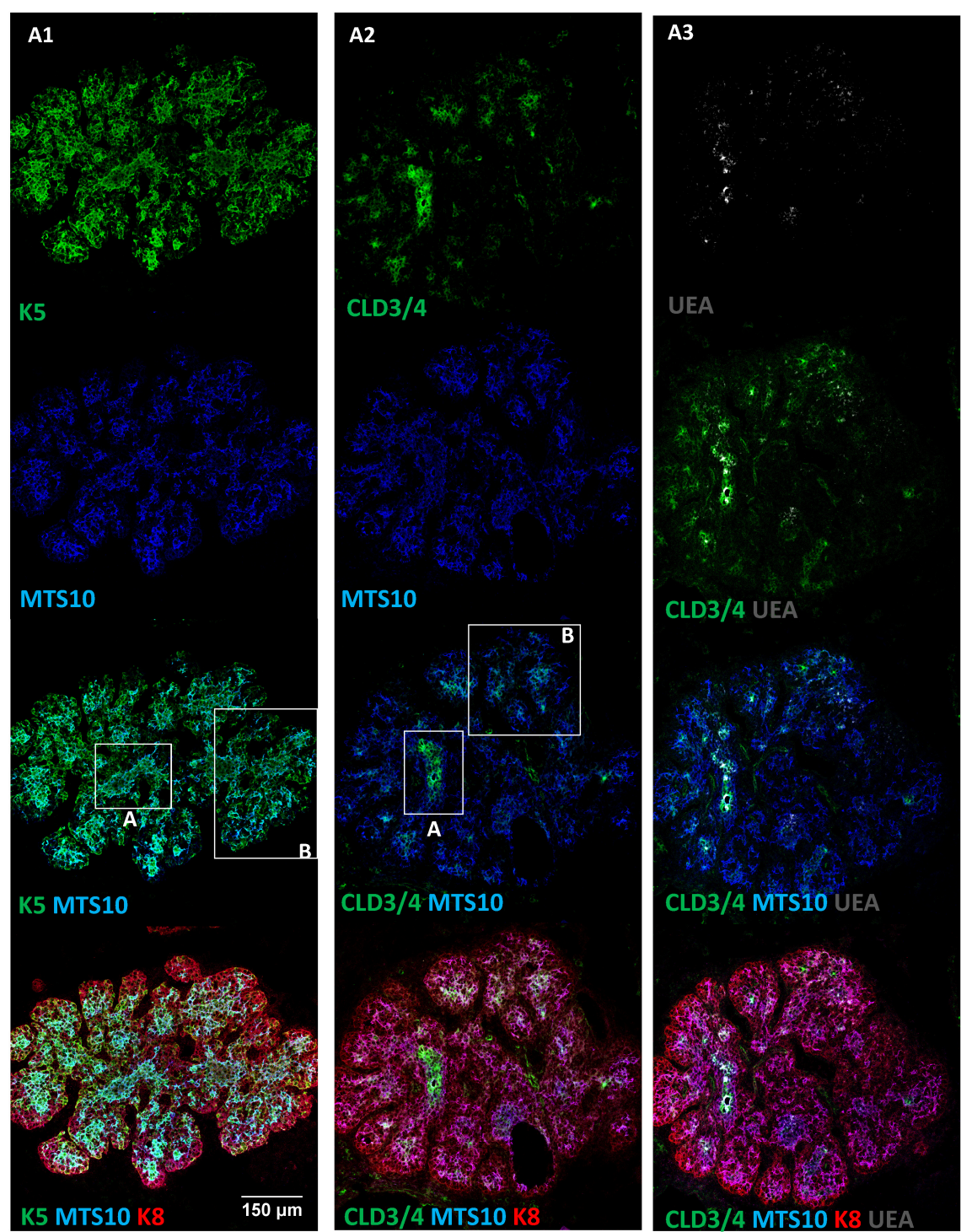


Figura 46 A

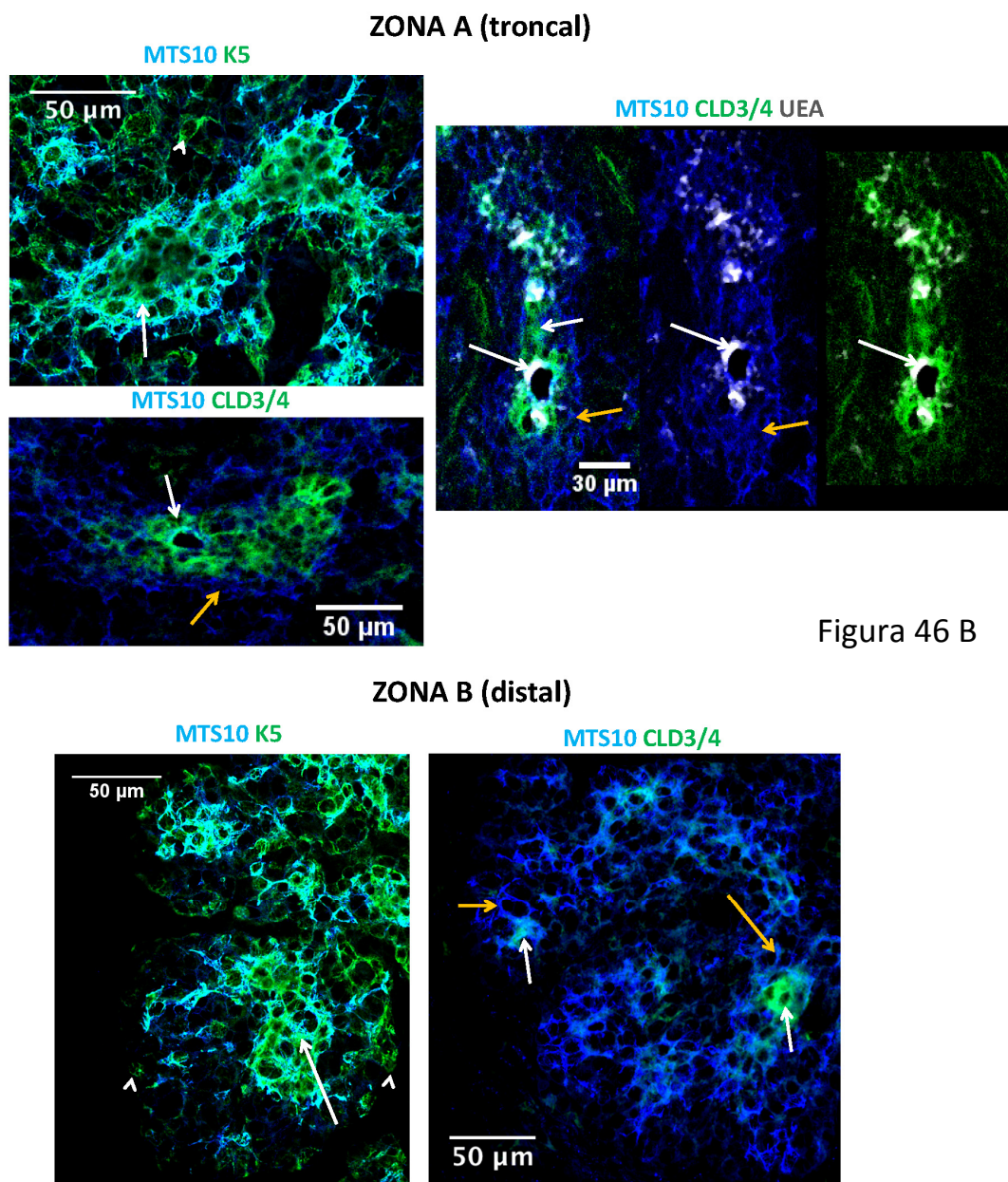


Figura 46 B

Figura 46. En timos NSG de 18,5 dpc. se distinguen una zona troncal y otra distal, donde la expresión de MTS10 y K5 define un marcaje ramificado y continuo en cuya parte central se sitúan lúmenes y focos celulares Cld3/4+ que en las zonas más polarizadas expresan UEA. **A.** Crio secciones seriadas de 10 µm de un lóbulo tímico de 18,5 dpc. NSG, procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A1) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A2) y UEA (blanco) (A3). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa un lóbulo tímico muy lobulado con una zona central o troncal (zona A) y otra distal en los extremos del lóbulo (zona B). K5 y MTS10 definen una estructura ramificada y continua que engloba lúmenes y focos aislados Cld3/4+, siendo todo el epitelio K8+. **B.** Detalles de las zonas enmarcadas en A, objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. En ambas zonas distinguimos una población K5+Cld3/4+MTS10+/- que en ocasiones expresa UEA (flechas blancas) rodeada por una población celular K5+Cld3/4-MTS10+ (flechas amarillas) con algunas células más basales K5+Cld3/4-MTS10- (cabezas de flecha).

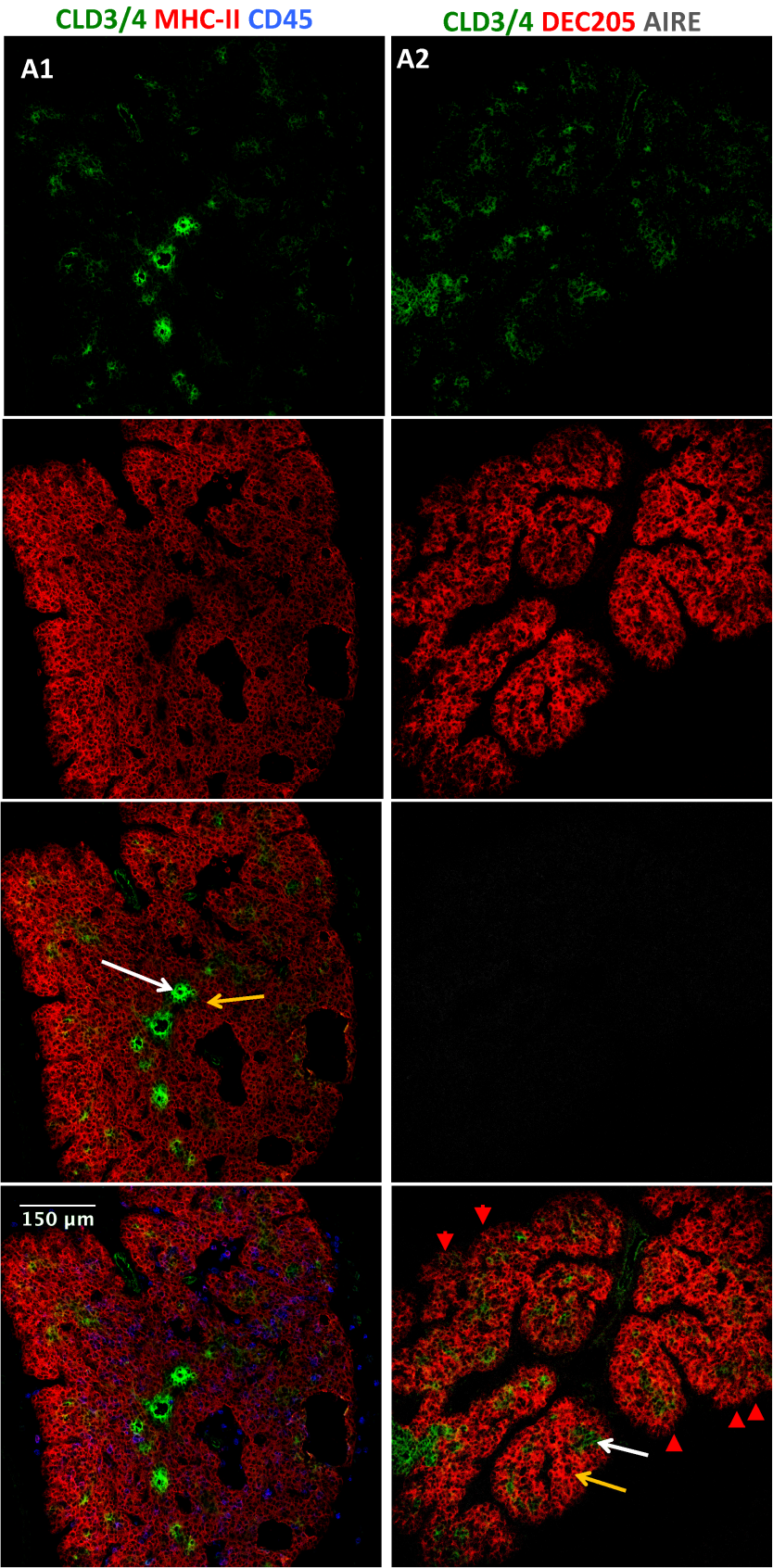
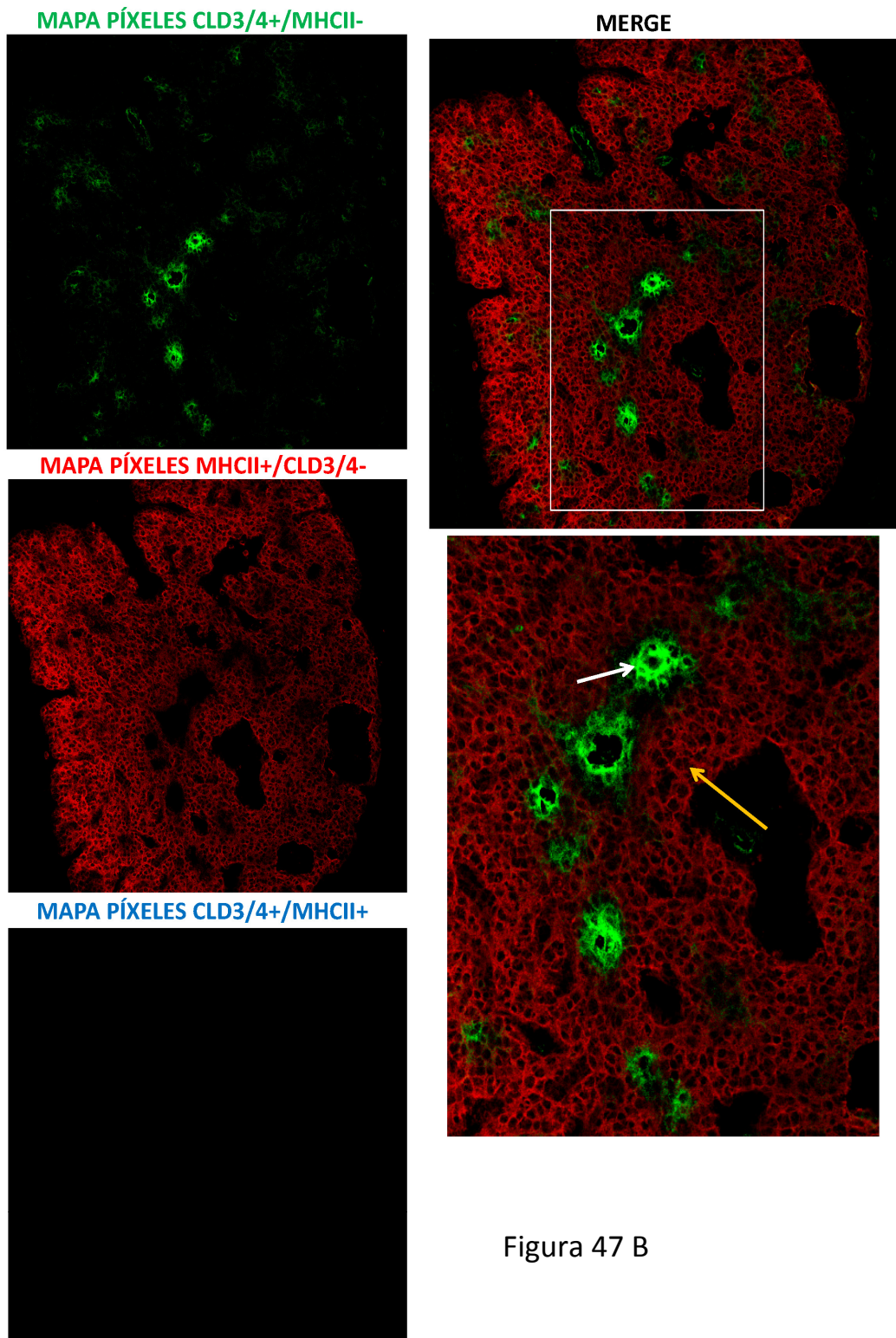


Figura 47 A



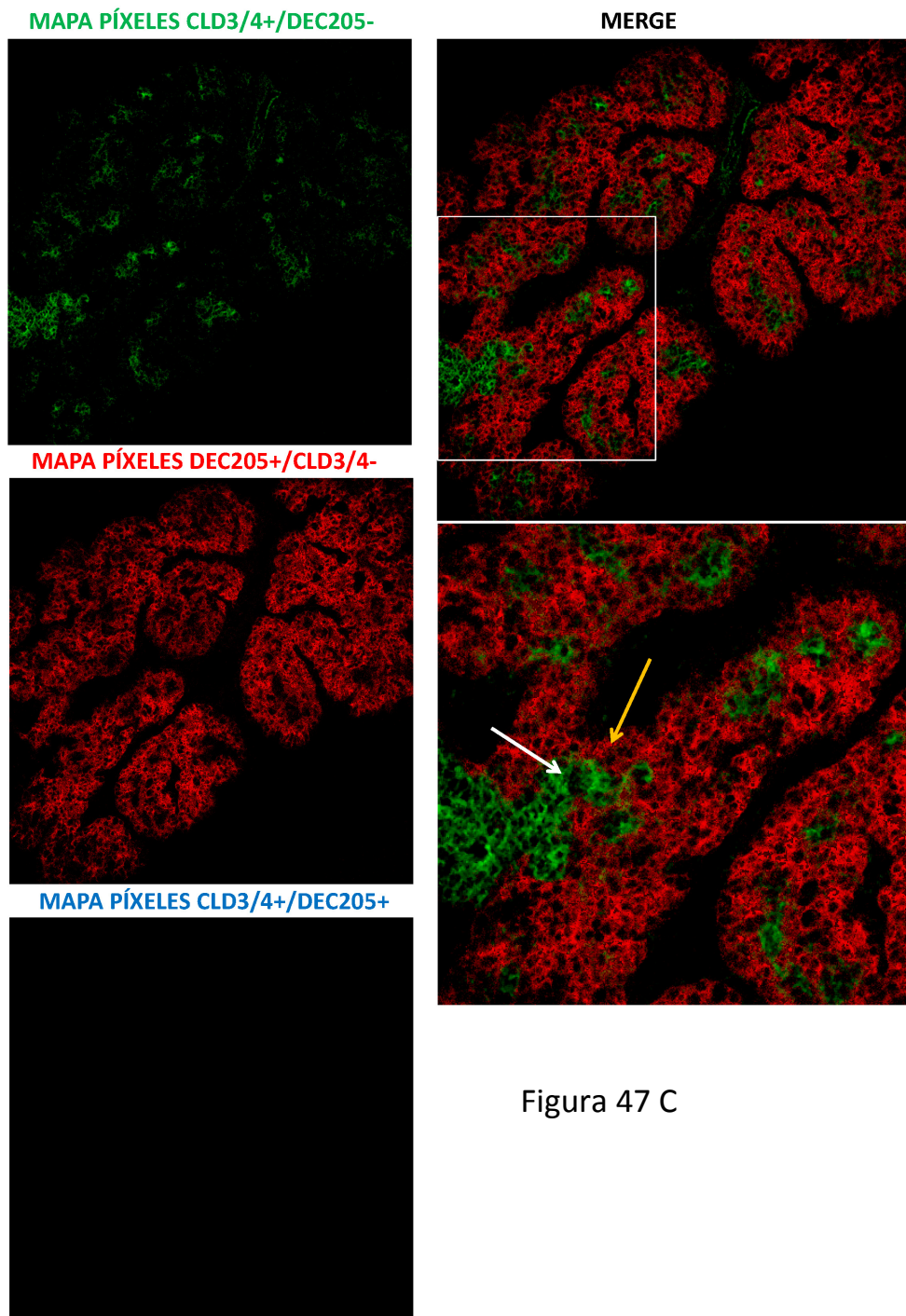


Figura 47 C

Figura 47. En timos de 18,5 dpc. NSG MHC-II y DEC205 se expresan casi en todo el epitelio, excepto en los focos y estructuras luminales Cld3/4+ y sigue sin expresarse AIRE. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de Cld3/4 (verde), MHC-II (rojo) y CD45 (azul) (**A1**) o Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y AIRE (ausente, blanco) (**A2**). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. No hay expresión de AIRE y se observan algunas, muy pocas, células CD45+ dispersas en el interior del timo. MHC-II y DEC205 (flechas amarillas) se expresan de forma generalizada excepto en los focos y lúmenes Cld3/4+ (flechas blancas). Las flechas rojas indican la subcápsula DEC205-/lo. **B.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (verde) y MHCII+/Cld3/4- (rojo), así como la población doble positiva para ambos (ausente, azul), la superposición de las tres poblaciones y un detalle ampliado (zona enmarcada). La población MHC-II+ (flecha amarilla) y la Cld3/4+ (flecha blanca) son excluyentes. **C.** Mapa de píxeles donde se muestra la colocalización entre DEC205 y Cld3/4, mostrando las poblaciones Cld3/4+/DEC205- (verde) y DEC205+/Cld3/4- (rojo), la población doble positiva para ambos (ausente,

azul), así como la superposición de las tres poblaciones y un detalle ampliado (zona enmarcada). La población DEC205+ (flecha amarilla) y la Cld3/4+ (flecha blanca) son excluyentes.

Este patrón histológico del timo NSG a los 3 días postnatal ya definía una compartimentalización compatible con la existencia de corteza y médula. MTS10 ocupaba la región central a lo largo de toda la estructura con sus lobulaciones, en el centro de la cual se situaban las células Cld3/4+ formando lúmenes, quistes, rosetas o alineamientos (fig. 48 A, B). La expresión de UEA suponía a esta edad una proporción muy alta de la población Cld3/4+ (fig. 48 A, B). La expresión de MHC-II se extendía por todo el epitelio excepto por las regiones Cld3/4+ (fig. 49 A, B) al igual que en el estadio anterior, mientras que la de DEC205 sufría algunas modificaciones (fig. 49 A, C, D). En la zona troncal observamos que las células Cld3/4+ puntualmente expresaban MTS10, pero en ningún caso DEC205, por lo que quedaban constituidas por una población Cld3/4+MTS10+/-DEC205-. Circundante a ésta, hacia la basal encontrábamos otra región en la que las células han perdido la expresión de DEC205, a diferencia de los estadios anteriores, quedando constituida por células Cld3/4-MTS10+DEC205-. En la zona distal los focos Cld3/4+ estaban englobados en una región central MTS10+ más extensa, no expresándose en ninguna de estas zonas DEC205. Desde estas regiones hacia la basal, lo que podríamos asemejar con la corteza interna, se observaba expresión de DEC205, con algunas células dispersas DEC205+ que expresaban MTS10, siendo, por tanto, Cld3/4-MTS10+/-DEC205+ (fig. 49 A, C). Ya hacia la periferia del órgano, lo que sería semejante a la corteza externa y la subcápsula tímicas, se observaba que la estructura ramificada definida por la expresión de MTS10 se extendía en algunos puntos hasta los extremos del órgano identificados por el marcaje de E-cadherina, donde no se detectaba expresión de DEC205, de manera que la subcápsula del timo estaba compuesta por una población celular Cld3/4-MTS10+/-DEC205- (fig. 49 A, D).

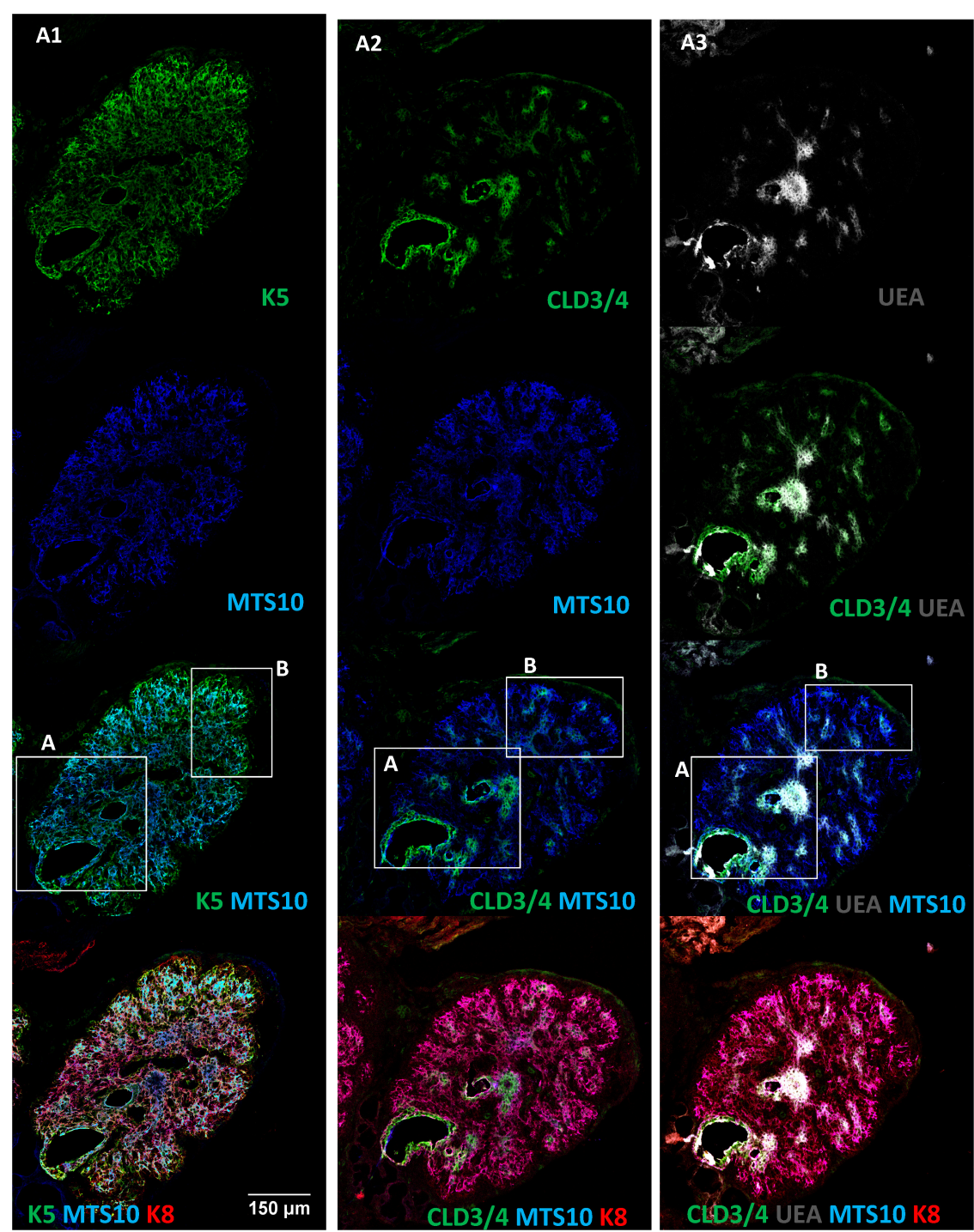


Figura 48 A

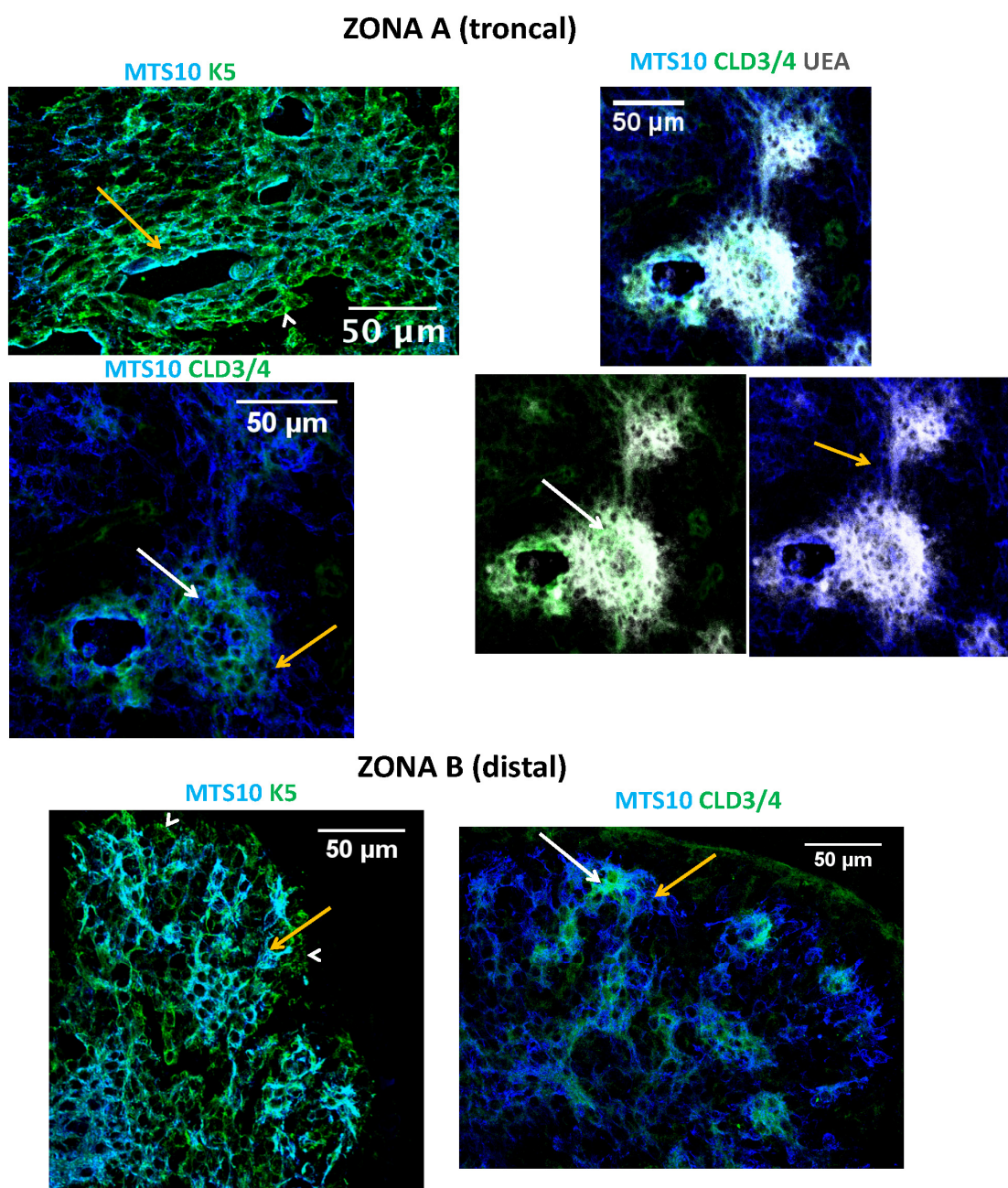


Figura 48 B

Figura 48. En timos NSG de 3 días postnatal, la expresión de MTS10 y K5 forma una estructura ramificada continua en cuyas zonas centrales se observan focos y lúmenes Cld3/4+ que, generalmente, expresan UEA, distinguiéndose dos zonas, troncal y distal. **A.** Criosecciones seriadas de 10 μm procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A1), o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (A2) y UEA (blanco) (A3). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B.** Proyecciones de máxima intensidad resultantes del escaneo en xyz con una separación de 0,4 μm entre planos de las zonas enmarcadas en A. Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Se distinguen dos zonas en el lóbulo, una troncal donde se observan grandes lúmenes (zona A) y otra distal, sin lúmenes tan evidentes, en los extremos de las lobulaciones (zona B), con un marcaje ramificado continuo y bastante generalizado de K5 y MTS10, siendo todo el epitelio K8+. Las flechas blancas señalan la población celular K5+MTS10+Cld3/4+UEA+, rodeada por un población más amplia K5+MTS10+Cld3/4- (flechas amarillas), con presencia de algunas células K5+MTS10-Cld3/4- (cabezas de flecha) en zonas externas más basales.

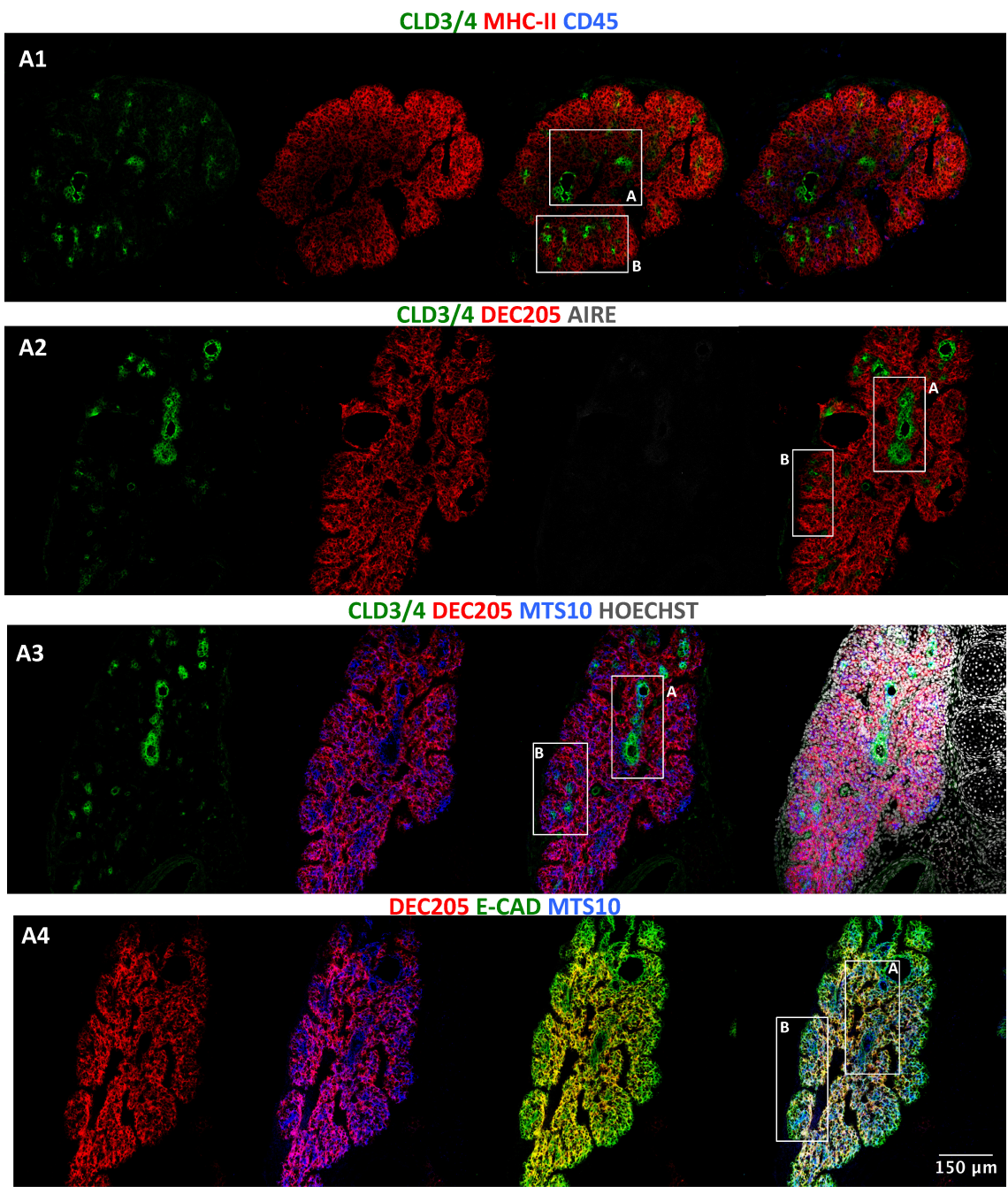


Figura 49 A

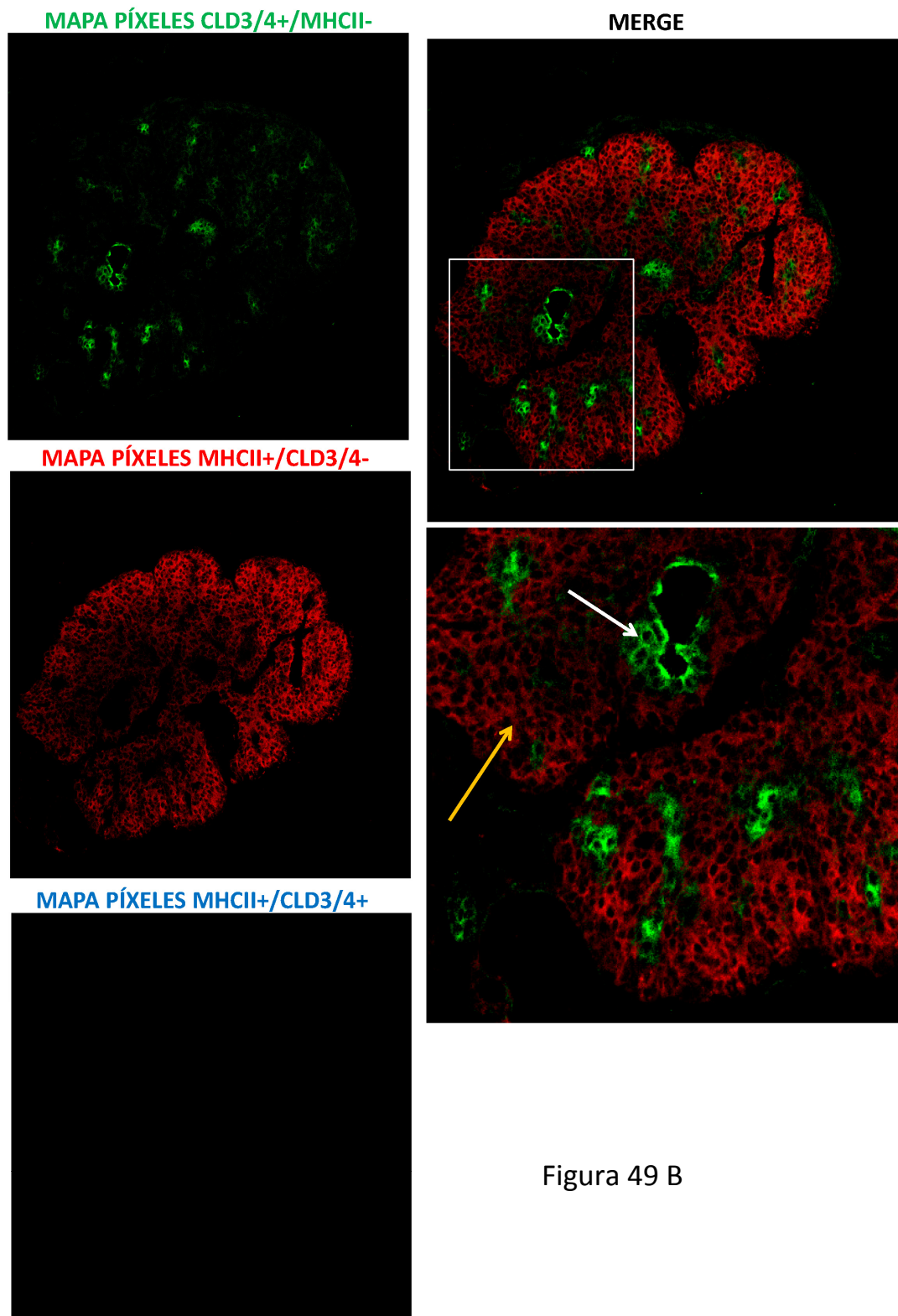


Figura 49 B

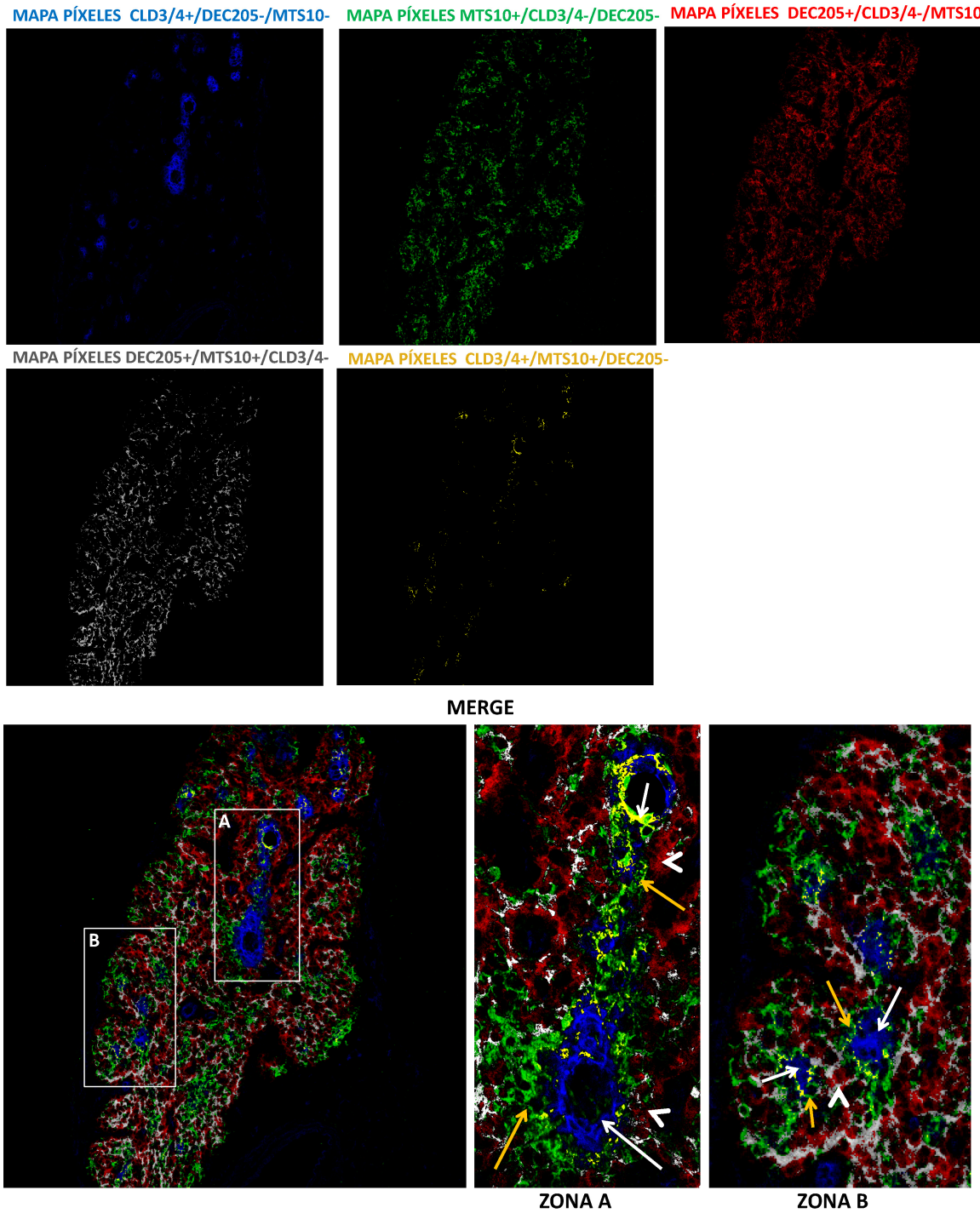


Figura 49 C

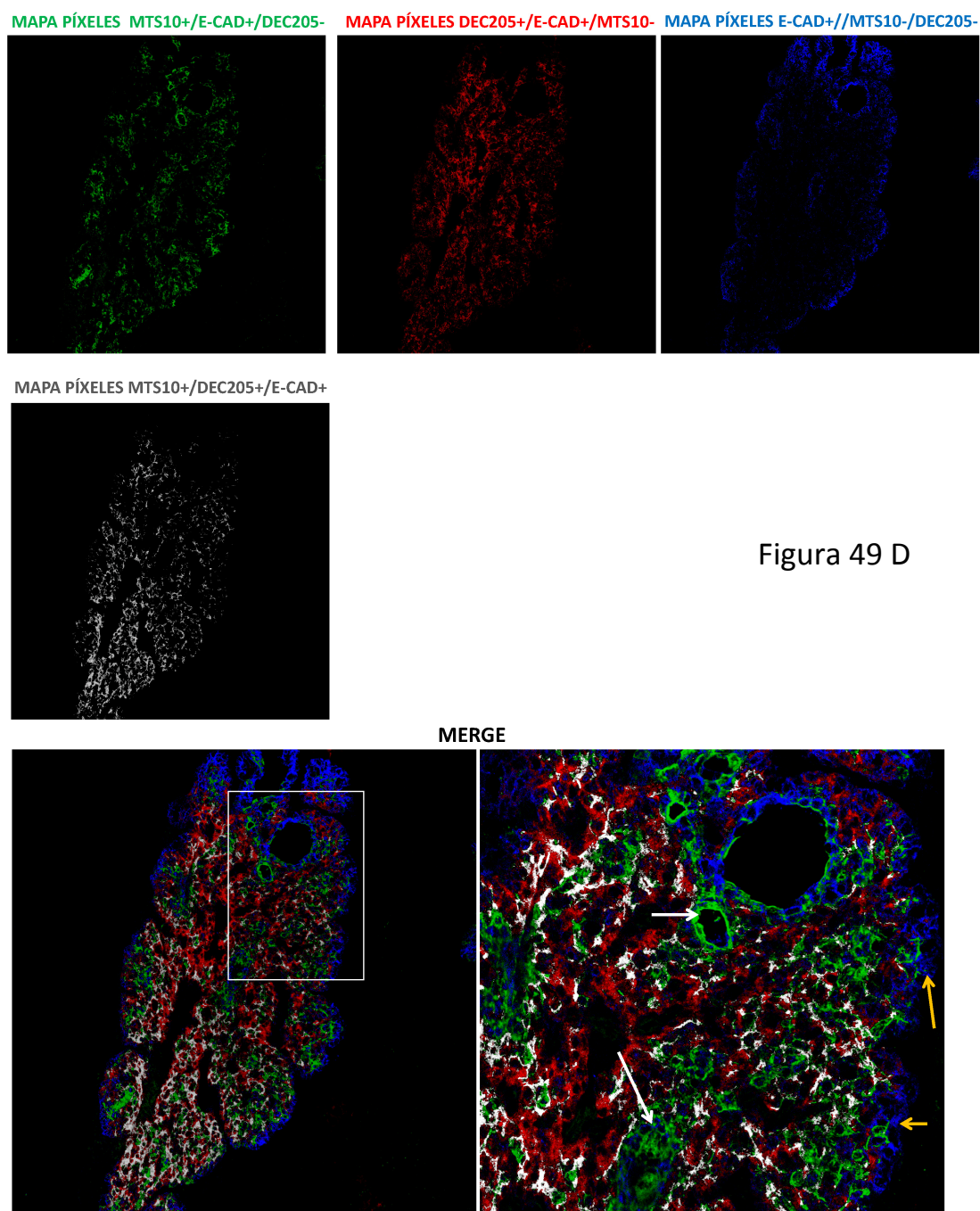


Figura 49 D

Figura 49. En timos postnatales NSG de 3 días la expresión de MHC-II y DEC205 es excluyente con las regiones Cld3/4+, estando además DEC205 ausente en las zonas MTS10+ circundantes a éstas y en la zona subcapsular. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de Cld3/4 (verde), MHCII (rojo) y CD45 (azul) (**A1**); Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y AIRE (ausente, blanco) (**A2**); Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo), MTS10 (azul) y Hoechst (blanco) (**A3**); DEC205 (rojo), E-cadherina (verde) y MTS10 (azul) (**A4**). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se distinguen en el lóbulo la zona troncal (zona A) y la distal (zona B) y unas pocas células CD45+ dispersas. La expresión de MHC-II y la de DEC205 está bastante extendida por todo el epitelio excepto en las regiones Cld3/4+, formando un entramado coincidente en varias zonas con la población MTS10+. No hay expresión de AIRE. **B.** Mapas de píxeles donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (verde) y MHCII+/Cld3/4- (rojo), así como la población doble positiva para ambos (ausente, azul), una superposición de las tres poblaciones y un

detalle de las mismas (enmarcado). MHC-II (flecha amarilla) se expresa por todo el epitelio excepto en las zonas Cld3/4+ (flecha blanca). **C.** Colocalización de los marcadores Cld3/4, MTS10 y DEC205, donde se muestran las poblaciones simples positivas para cada uno de ellos (azul, verde y rojo, respectivamente), así como la doble positiva DEC205+/MTS10+ (blanco) o Cld3/4+/MTS10+ (amarillo), una superposición de todas las poblaciones y detalles de la zona troncal (zona A) y distal (zona B). Las flechas blancas señalan la población apical Cld3/4+/MTS10+/-DEC205-, las amarillas la población periférica a la anterior formada por células Cld3/4-/MTS10+/DEC205- y las cabezas de flecha la población periférica a éstas hacia la basal Cld3/4-/MTS10+/-DEC205+. **D.** Colocalización de los marcadores MTS10, DEC205 y E-cadherina donde se muestran las poblaciones dobles positivas junto con E-cadherina para cada uno de ellos (verde, rojo y azul, respectivamente), así como la triple positiva para DEC205, MTS10 y E-cadherina (blanco), una superposición de todas las poblaciones y un detalle (zona enmarcada). DEC205 además de no expresarse en las zonas más apicales MTS10+ (flechas blancas), tampoco se expresa en la subcápsula (flechas amarillas), donde si se observa alguna célula MTS10+.

Analizamos también mediante inmunomarcaje la expresión de CD80 en timos postnatales NSG de 3-4 días. Observamos células de aspecto linfoide CD80+ en las proximidades del timo situadas en muchos casos en las trabéculas, pero los estudios de colocalización no identificaron células epiteliales tímicas que expresasen dicho marcador (fig. 50). Esto, sumado a la expresión por parte de las células CD45+ de CD11 en su membrana, descrito anteriormente en timos *Ikaros* -/- (no mostrado), parece indicar que se podrían tratar de células dendríticas. A 7 días postnatal se mantenía este mismo patrón (fig. 51).

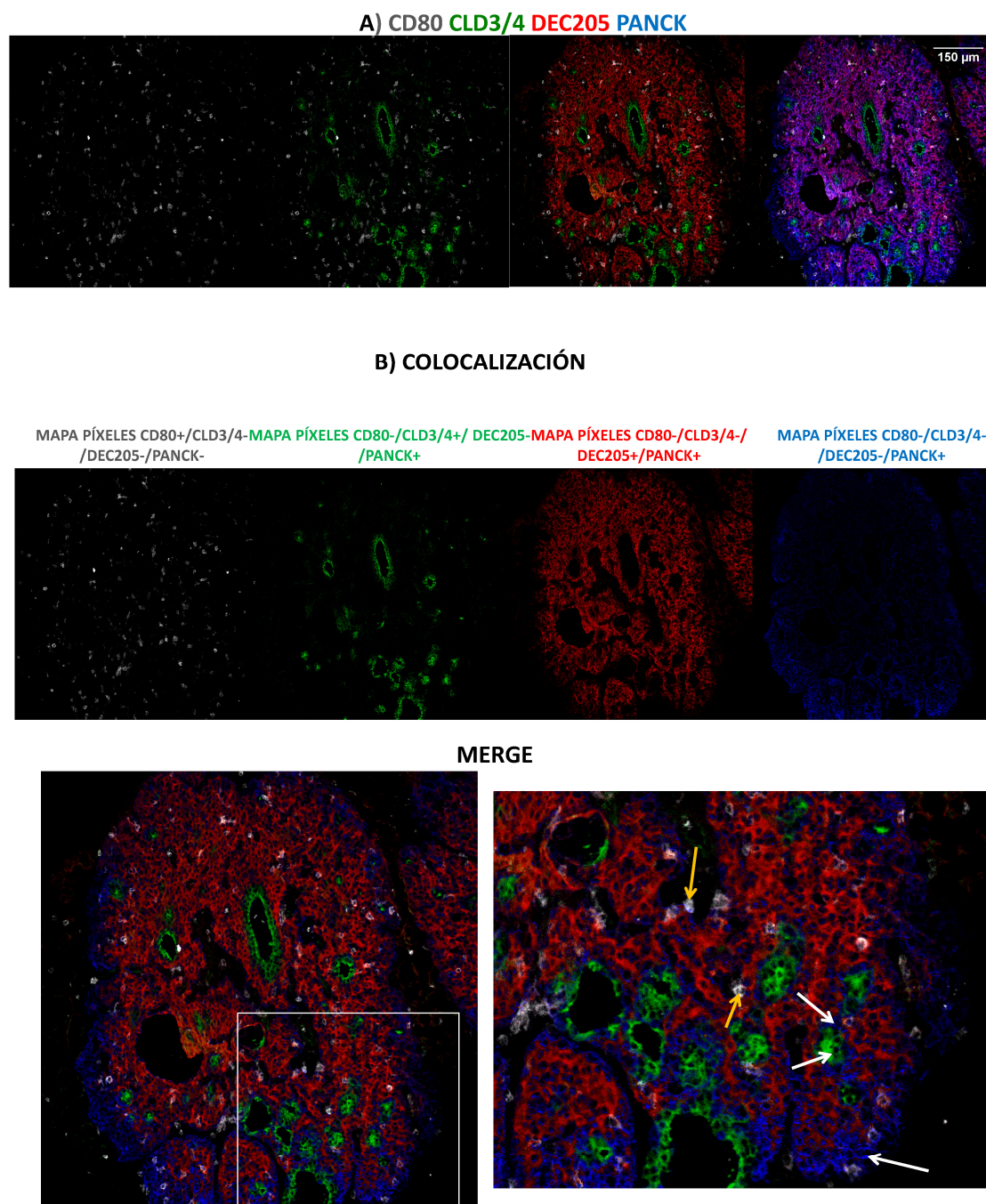


Figura 50. Los timos de ratones NSG neonatos no expresan el marcador medular CD80 en su epitelio.

A. Criosecciones de 10 µm de timos NSG de 3-4 días postnatal procesadas para inmunodetección de CD80 (blanco), Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y pancitoqueratina (azul) escaneadas con un objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B.** Colocalización de los marcadores anteriores donde se muestran las poblaciones simples positivas para CD80 (blanco), Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y pancitoqueratina (azul), así como una superposición de todas las poblaciones y un detalle (zona enmarcada). Se observa que las células CD80+ no se expresan en el epitelio medular, sino en células pequeñas situadas en las trabéculas o en la periferia del timo (flechas amarillas). Los focos Cld3/4+, su periferia y la subcápsula no expresan DEC205 (flechas blancas).

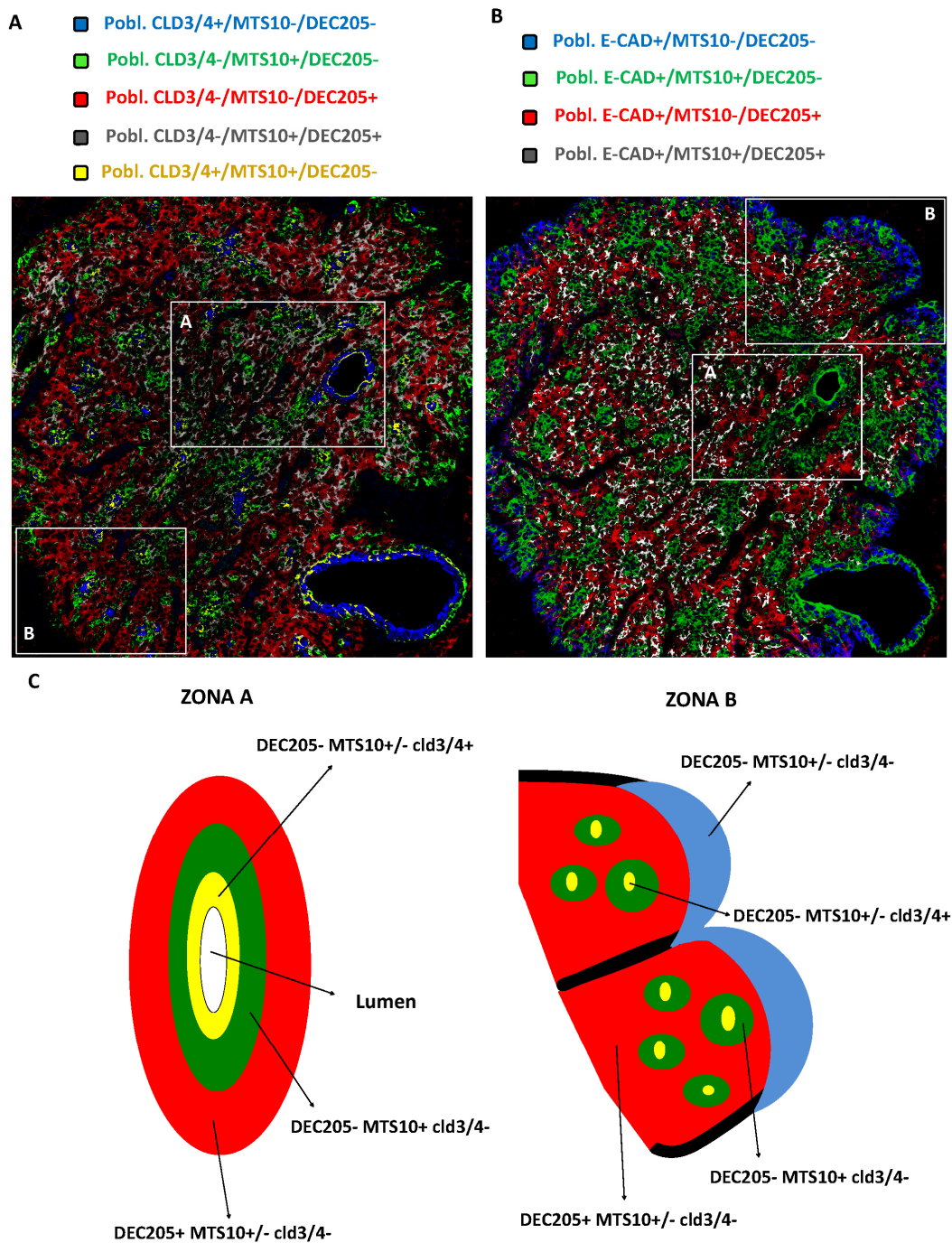


Figura 51. En timos NSG de 7 días postnatal, DEC205 no se expresa en las regiones Cld3/4+ y su periferia MTS10+, ni en la zona subcapsular. **A.** Colocalización de las expresiones de DEC205, Cld3/4 y MTS10 en secciones donde se superponen las poblaciones Cld3/4+MTS10-DEC205- (azul), Cld3/4-MTS10+DEC205- (verde), Cld3/4-MTS10-DEC205+ (rojo), Cld3/4-MTS10+DEC205+ (blanco) y Cld3/4+MTS10+DEC205- (amarilla). **B.** Colocalización de las expresiones de DEC205, E-cadherina y MTS10 donde se observa una superposición de las poblaciones Ecad+MTS10-DEC205- (azul), Ecad+MTS10+DEC205- (verde), Ecad+MTS10-DEC205+ (rojo) y Ecad+MTS10+DEC205+ (gris). Se distinguen la zona troncal (zona A) y la distal (zona B). DEC205 se expresa en todo el epitelio excepto en las regiones Cld3/4+ y su región circundante MTS10+. Se observa alguna célula dispersa en zonas no apicales MTS10+DEC205+. La subcápsula no expresa DEC205 pero algunas células dispersas son MTS10+. **C.** Esquema representativo de las poblaciones epiteliales en timos postnatales alinfoides en las zonas tanto troncal (zona A) como distal (zona B).

A partir de esta organización tímica postnatal había un crecimiento que implicaba un engrosamiento del órgano y un cambio en la expresión de MTS10 y K5, de manera que en el timo adulto alinfoide K5 pasaba a expresarse por todo el epitelio y MTS10 de forma dispersa en algunas de las áreas CLD3/4+ y en las zonas circundantes a éstas (fig. 52 A, B); así a 20 días postnatal, la población celular DEC205+MTS10+ era menor que en los estadios anteriores, pero continuaban existiendo las mismas poblaciones descritas a 3 y 7 días postnatal (fig. 53 A-C).

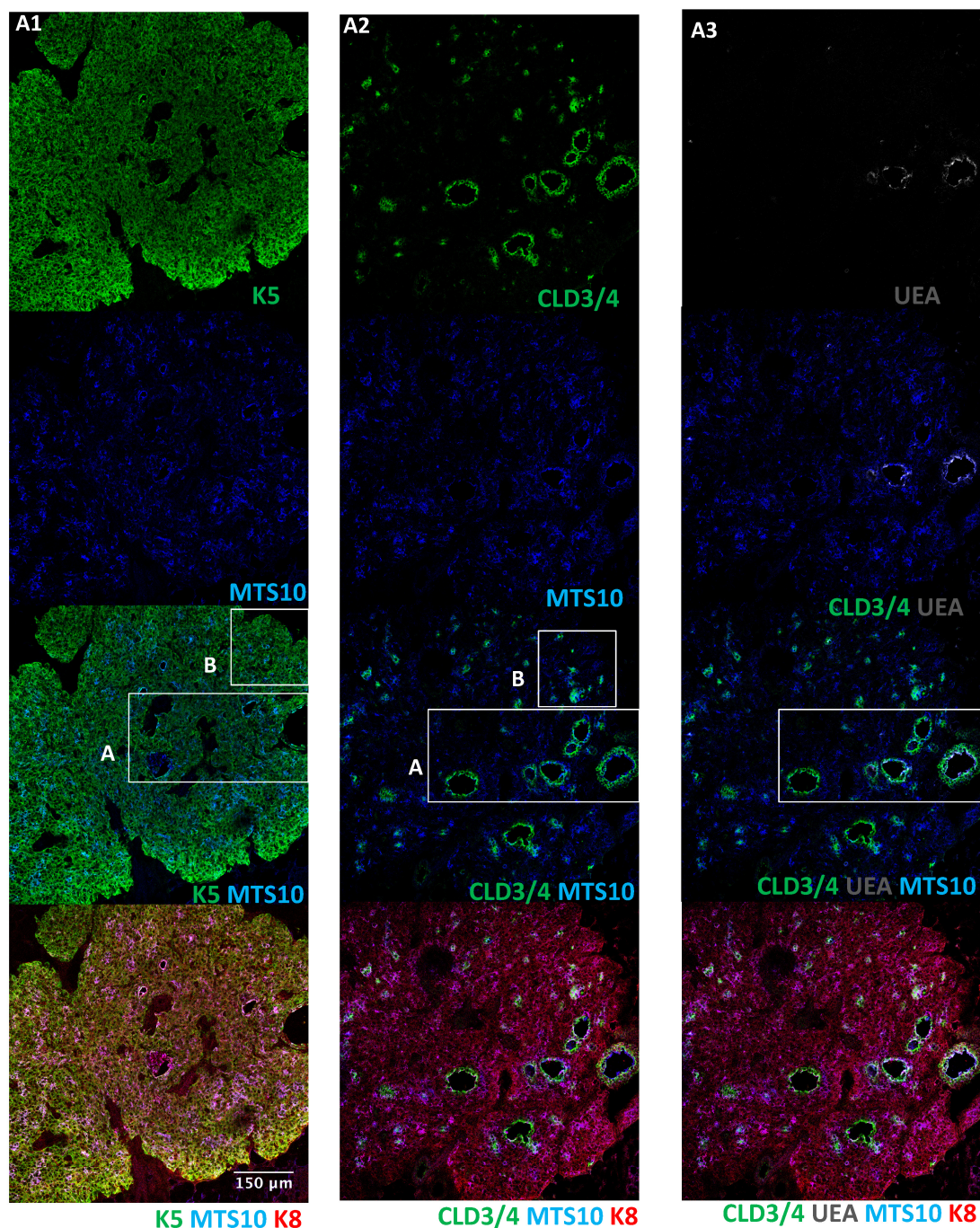


Figura 52 A

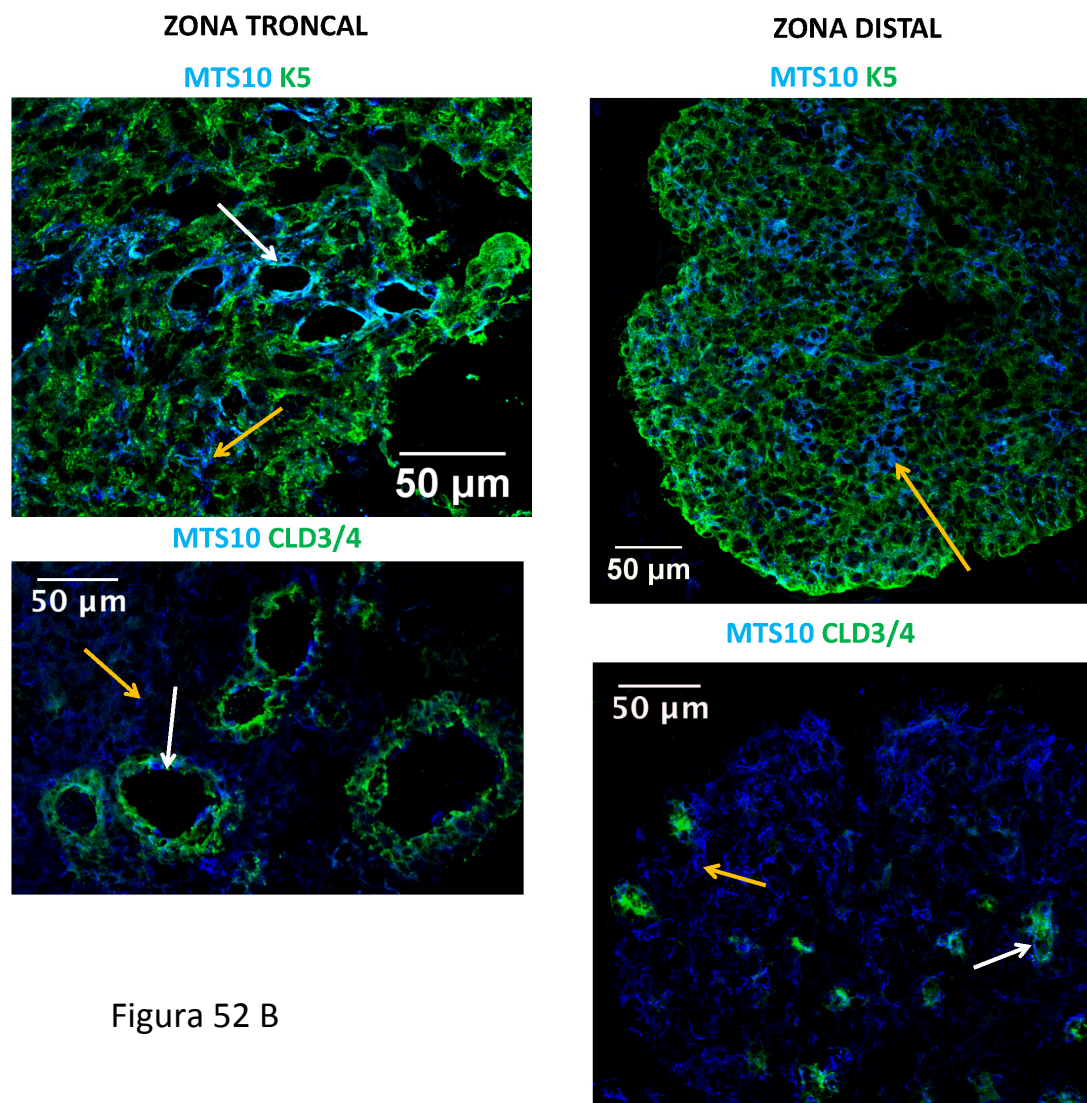


Figura 52 B

Figura 52. En timos NSG postnatales de 20 días todo el epitelio es K5+K8+, y MTS10 se expresa de forma más dispersa asociado a las células Cld3/4+ y su periferia. **A.** Criosecciones seriadas de 10 µm procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A1**), y Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A2**) y UEA (blanco) (**A3**). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B.** Detalles de las zonas enmarcadas, obtenidas por el escaneo en xyz con objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV con una separación de 0,4 µm entre secciones y posterior proyección en Z. Se distinguen dos zonas en el lóbulo, una más central con grandes lúmenes (zona A) y otra distal en los extremos de las lobulaciones (zona B). Todo el epitelio es K5+K8+. MTS10 se expresa de forma dispersa asociado a los focos y estructuras luminales Cld3/4+ (flechas blancas) y en las regiones circundantes a éstas (flechas amarillas). UEA se expresa asociado a algunas células Cld3/4+.

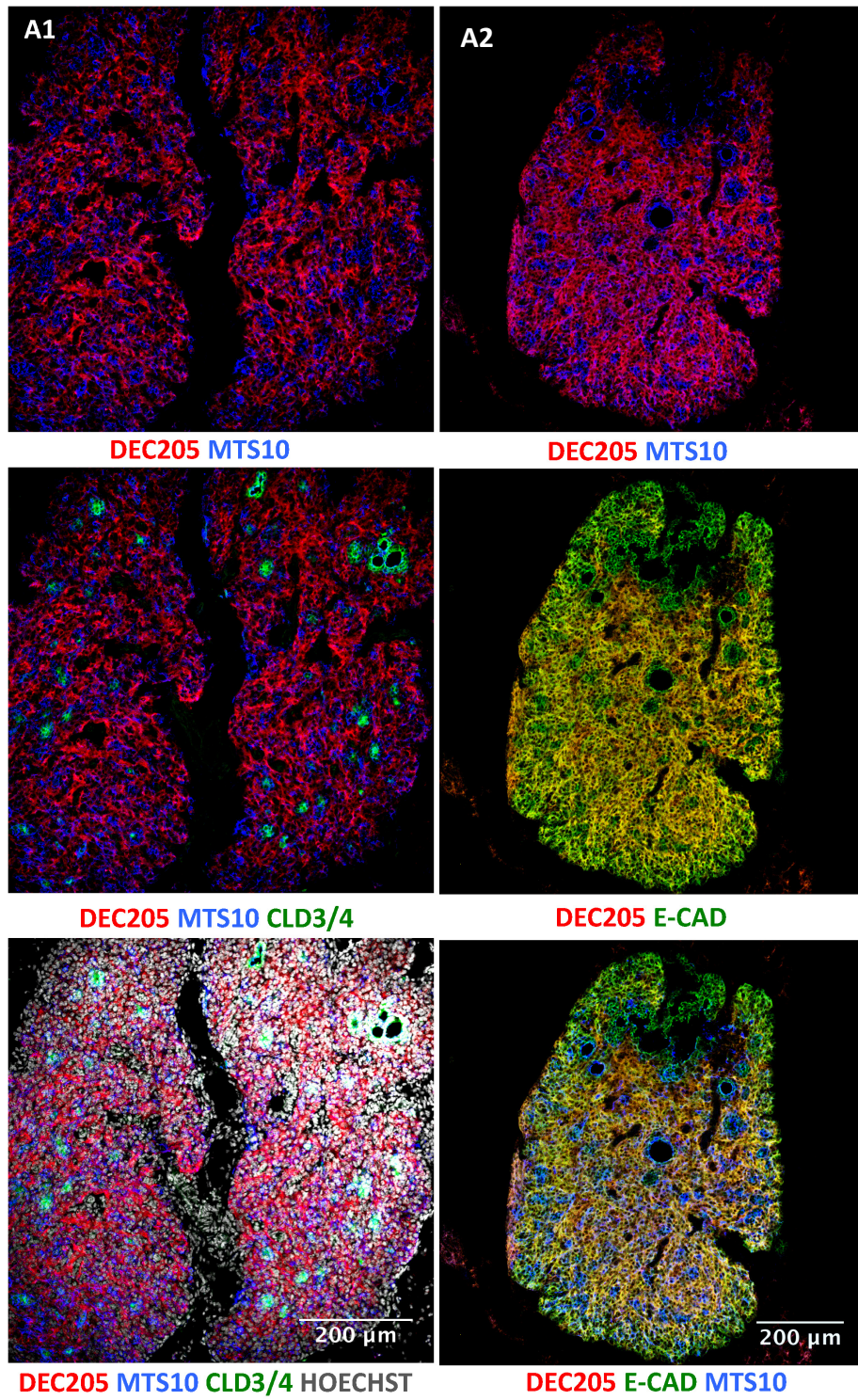


Figura 53 A

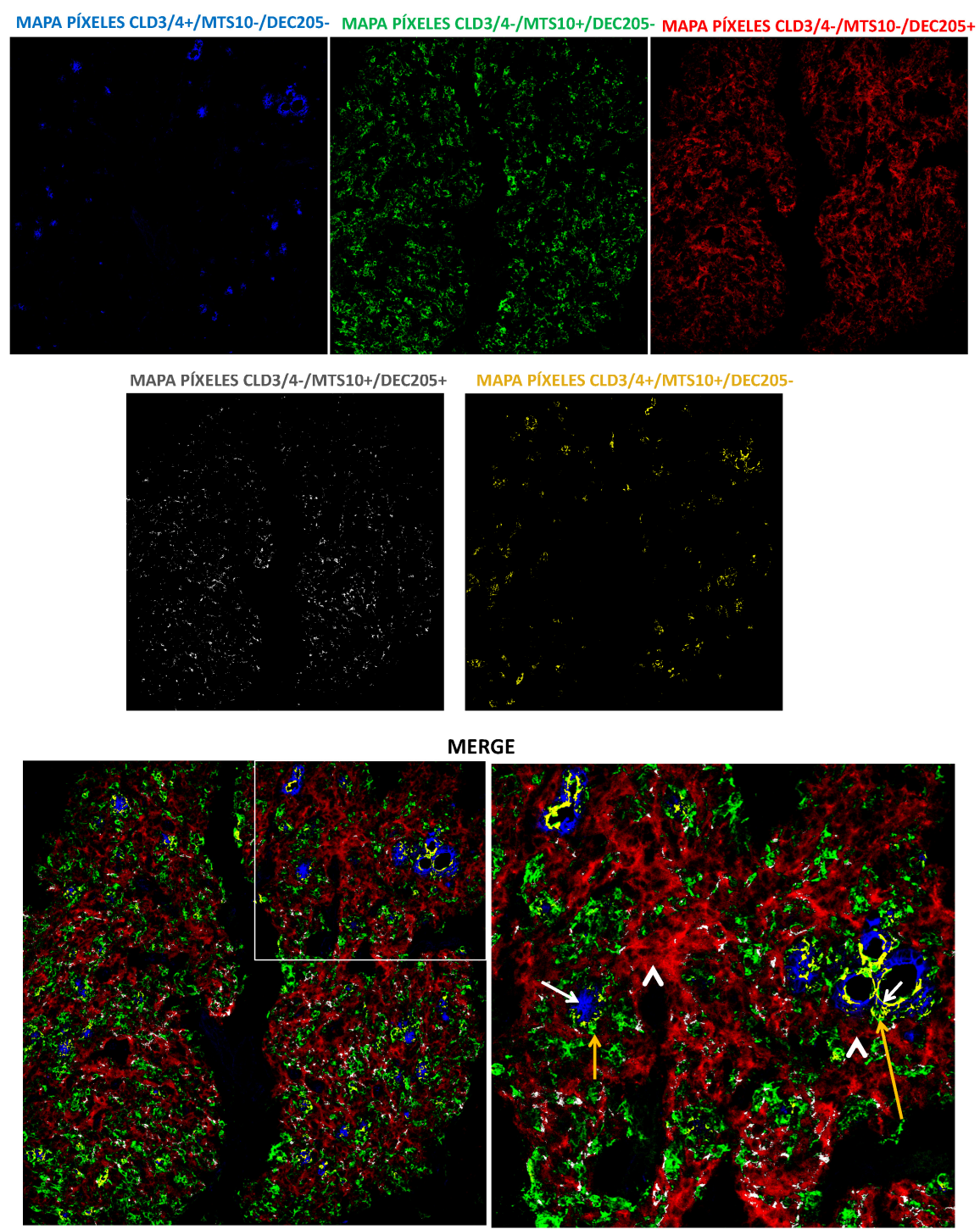


Figura 53 B

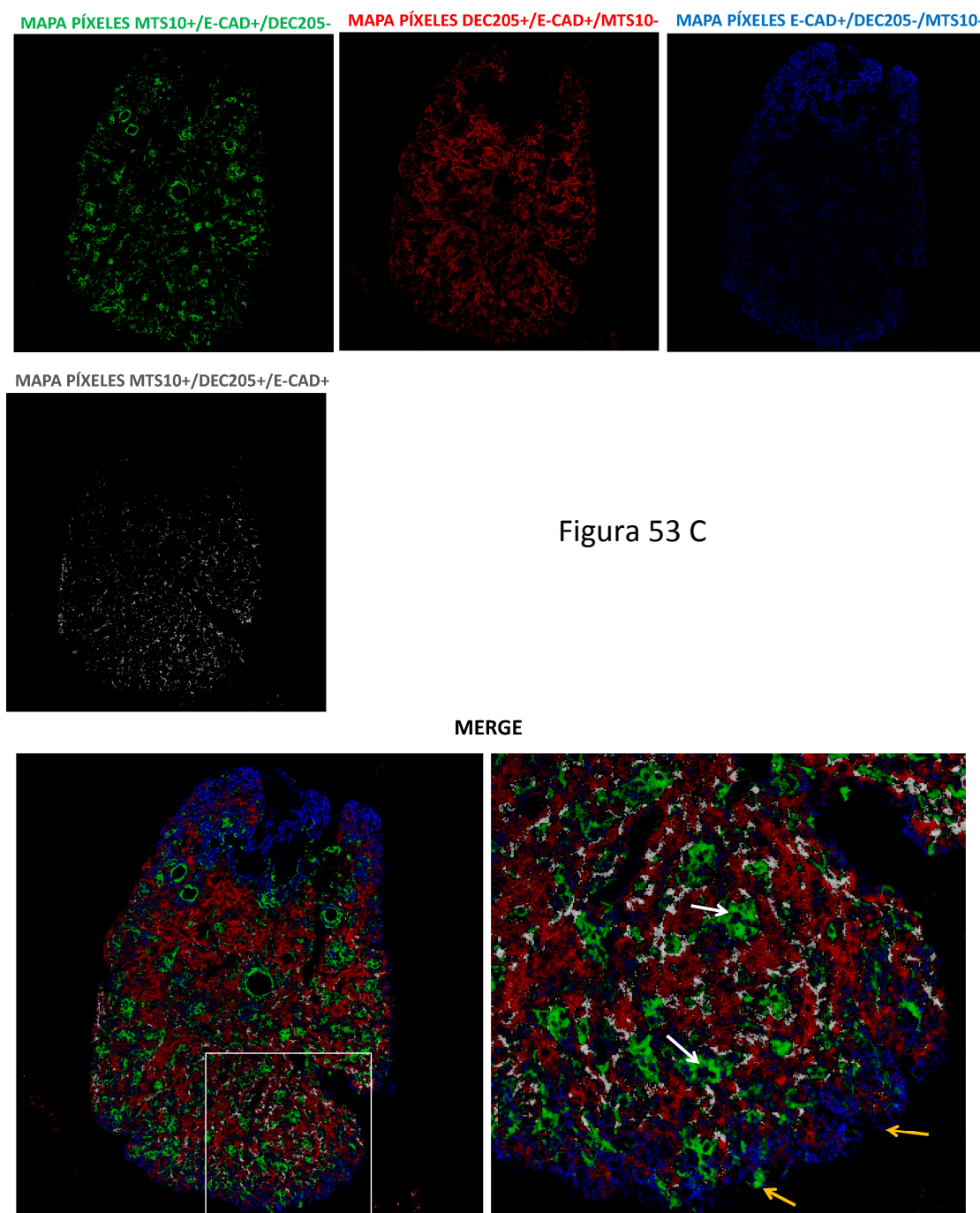


Figura 53. En timos postnatales NSG de 20 días DEC205 no se expresa en la zona subcapsular ni en las células apicales Cld3/4+ y su periferia inmediata MTS10+. MTS10 se expresa en zonas basales y subcapsulares de forma más dispersa que en estadios anteriores. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de Cld3/4 (verde), DEC205 (rojo) y Hoechst (blanco) (**A1**) o DEC205 (rojo), E-cadherina (verde) y MTS10 (azul) (**A2**). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV o HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B.** Mapas de píxeles donde se muestra la colocalización entre Cld3/4, MTS10 y DEC205, representándose las poblaciones simples positivas para cada uno de ellos (azul, verde y rojo, respectivamente) y las dobles positivas DEC205+MTS10+ (blanco) y Cld3/4+MTS10+ (amarillo). DEC205 muestra un marcaje excluyente con las regiones apicales Cld3/4+/MTS10+/- (flechas blancas) y su periferia más inmediata MTS10+ (flechas amarillas), encontrando células dispersas MTS10+/DEC205+ en zonas más basales, que son mayoritariamente MTS10-/DEC205+ (cabezas de flecha). **C.** Colocalización de los marcadores MTS10, DEC205 y E-cadherina

donde se muestran las poblaciones dobles positivas junto con E-cadherina para cada uno de ellos (verde y rojo, respectivamente), la simple positiva para E-cadherina (azul), así como la triple positiva para DEC205, MTS10 y E-cadherina (blanco). Se observa que DEC205 se expresa en todo el epitelio excepto en las regiones apicales MTS10+ (flechas blancas) y la zona subcapsular (flechas amarillas), donde algunas células dispersas expresan MTS10.

Analizamos también en timos postnatales *NSG* de 20 días la expresión de estos marcadores relacionados con la funcionalidad tímica mediante citometría de flujo. A partir de suspensiones tímicas analizamos la expresión de marcadores corticales como MHC-II, DEC205 y Ly51, y medulares como CD80, MHC-II y UEA, acotando la población de células epiteliales mediante la expresión del marcador específico para células epiteliales EpCAM y la FSC-H (fig. 54). Observamos que la totalidad de las células epiteliales expresaban Ly51, mientras que el resto de los marcadores se expresaban en distintas proporciones, lo que concordaba a groso modo con los resultados obtenidos mediante inmunomarcaje. Aproximadamente un 85% de las TECs eran MHC-II+, confirmando los datos inmunohistoquímicos donde aparentemente todas las TECs excepto las Cld3/4+ expresaban dicho marcador. Las TECs DEC205+ suponían un 40-45% del total del epitelio, de acuerdo con lo observado por inmunomarcaje, donde DEC205 se expresaba en las células situadas en las capas basales, pero no en las apicales Cld3/4+, la región circundante a ésta, MTS10+ ni en la subcápsula. También, mediante inmunomarcaje habíamos observado que algunas de las células Cld3/4+ asociadas al lumen expresaban puntualmente UEA, lo que confirmó también la citometría de flujo, que identificaba un 15% de TECs UEA+. Por otro lado, ya habíamos observado mediante inmunomarcaje la ausencia de TECs CD80+ en timos *NSG*, lo que se corroboraba ahora en el análisis citofluorométrico. Además, dado que las TECs K5+K8+ se consideran células inmaduras (*Bennett y cols., 2002*) y como se ha explicado anteriormente todas las células epiteliales de timos adultos *NSG* expresan K5 y K8, quisimos comprobar si realmente estábamos ante timos con epitelios inmaduros. Para ello analizamos la expresión de la glicoproteína de membrana MTS20, definida como marcador de TECs tempranas inmaduras pero de función desconocida (*Gill y cols., 2002*). En timos *wt* de 12,5 dpc. la población doble positiva K5K8 contiene las células MTS20+MTS24+, capaces de generar un timo funcional *in vivo* (*Bennett y cols., 2002*). En el primordio tímico temprano la expresión de MTS20 es generalizada, pero va reduciéndose a lo largo de la ontogenia hasta que en el timo adulto *wt* queda reducida

a una pequeña población medular. Observamos, mediante citometría de flujo, que algo más de la mitad de las TECs de timos adultos *NSG* expresaban dicho marcador, sugiriendo que estos timos son más inmaduros que los *wt* (fig. 54).

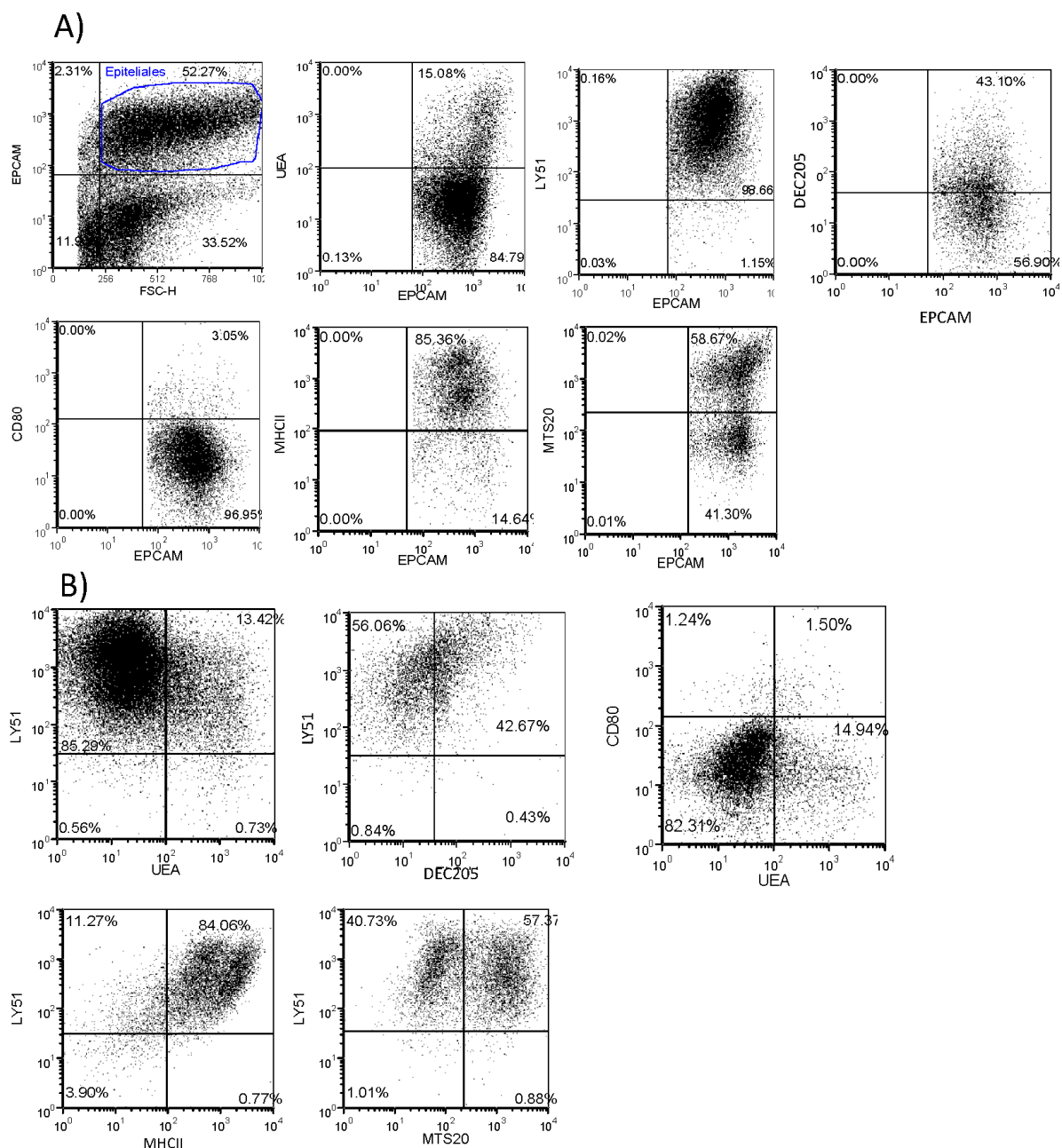


Figura 54. Expresión de marcadores epiteliales analizada por citometría de flujo en timos postnatales *NSG* de 20 días. A. Representación de la expresión de los distintos marcadores frente al marcador de células epiteliales EpcAM. **B.** Representación de las poblaciones dobles positivas, previamente seleccionadas de la región de células EpcAM+. Se observa que la expresión de FoxN1 es suficiente para inducir la aparición de marcadores típicos de corteza, como DEC205 o Ly51, pero no de marcadores específicos de médula, como CD80, aunque sí de MHC-II que se expresa en los dos compartimentos.

En definitiva, el desarrollo de timos alinfoides de ratones *Ikaros* $-/-$ o *NSG* seguía un patrón general que llevaba a una organización histológica final similar en ambos casos: presencia de estructuras acinares y lúmenes o quistes centrales en los mismos lugares y un patrón de aparente ramificación de células con cierta diferenciación luminal con expresión de K5 y MTS10 y algunas de ellas de Cld3/4. Este patrón se fundamenta en el patrón estructural de los timos *Nude*, que sufre una modificación presumiblemente debido a la expresión de FoxN1 en los timos alinfoides estudiados. Esta modificación implicaba fundamentalmente la no diferenciación luminal de células de la masa intermedia que, en el caso del timo *Nude*, seguía diferenciando y reorganizándose como lumen. En el caso del timo *Nude*, esta diferenciación luminal conllevaba la regulación positiva de Cld3/4, K5 y MTS10, cuya expresión se modificaba una vez que el proceso de reordenamiento y formación de lumen iba concluyendo, de manera que en las regiones estratificadas el epitelio se organizaba en capas en torno a ese lumen. En presencia de FoxN1 (timos alinfoides), la diferenciación inicial era similar, pero en este caso, a partir de un determinado momento las células centrales de la masa intermedia alrededor de las células Cld3/4+ iban aumentando la expresión de K5 y MTS10 sin que se produjera, o lo hiciera ligeramente, la regulación positiva de Cld3/4, lo que llevaba a la formación de un lumen discontinuo englobado en un área K5+MTS10+. Esta diferenciación luminal que en el timo *Nude* progresaba hasta implicar a la práctica totalidad de las células, aquí quedaba definitivamente interrumpida y en la periferia K5-MTS10- sólo algunas células regulaban positivamente la expresión de MTS10. Sobre esta estructura generada en presencia de FoxN1 y ausencia de células linfoides, el epitelio adquiría características funcionales propias del timo como la expresión de MHC-II, y algunas específicas del epitelio cortical como la expresión de DEC205. De hecho, la expresión diferencial de marcadores no funcionales definía regiones en el timo postnatal alinfoide que podríamos asociar con los clásicos compartimentos histológicos tímicos, corteza y médula. Las regiones que darán lugar a la médula tímica suponen las regiones MTS10+ que engloban o incluyen las áreas centrales Cld3/4+. Estas zonas, aunque no expresen marcadores típicos de un epitelio medular funcional, como CD80 o AIRE, sí expresan MHC-II, excepto las células Cld3/4+, y quedan definidas por la ausencia de marcadores

específicos de funcionalidad cortical. Las regiones corticales suponen, por tanto, el resto del epitelio tímico, que expresaba DEC205 y MHC-II, siendo la subcápsula tímica DEC205-MHC-II+. Sin embargo, durante el desarrollo fetal hasta 18 dpc., las células Cld3/4-MTS10- alrededor de las células Cld3/4+ sí expresaban DEC205. Al final del desarrollo las células Cld3/4+ regulaban negativamente MTS10, como en el caso del timo *Nude*, y su región circundante, que regulaba positivamente la expresión de K5 y MTS10, pero no o débilmente la de Cld3/4, dejaba de expresar DEC205.

3. Desarrollo de un epitelio tímico FoxN1+ tras su colonización linfoide postnatal: Estudio de ratones *Ikaros* -/- postnatales.

Como ya se ha descrito anteriormente, los timos fetales *Ikaros* -/- no son colonizados por precursores T, pero alrededor de los 3 días postnatal empieza a ser colonizado por precursores linfoides procedentes de la médula ósea (*Wang y cols., 1996*). Con el fin de comprobar que modificaciones histológicas y funcionales introducía la colonización linfoide en la estructura de timos desarrollados en ausencia de células linfoides hasta el estadio postnatal, analizamos la evolución de timos *Ikaros* -/- postnatales.

3.1. La expresión de marcadores funcionales de epitelio medular depende de la presencia de células linfoides en el timo.

Se analizó en varios estadios postnatales de timos *Ikaros* -/- desde que empiezan a ser colonizados, mediante inmunomarcaje al igual que en los casos anteriores, la expresión de K5, K8, MTS10, UEA y Cld3/4, así como de marcadores relacionados con la funcionalidad tímica como DEC205, MHC-II, AIRE y CD80, confirmándose la colonización linfoide mediante el marcador CD45.

A 3 días postnatal observamos un timo histológicamente igual al descrito para timos de la misma edad *NSG* (ver figs. 48-50), con una zona troncal y otra distal. Todo el epitelio era K8+, y K5 y MTS10 definían un continuo ramificado que incluía los focos o estructuras lumbinales Cld3/4+, aunque también se observaban células K5+MTS10- en zonas no apicales. La población UEA+ constituía una proporción muy alta de la población Cld3/4+ (fig. 55 A-C). A esta edad observábamos acúmulos de células CD45+

en las zonas próximas a los grandes quistes troncales Cld3/4+, no apareciendo en el resto del epitelio (fig. 56 A). En este estadio no detectamos expresión del regulador autoinmune AIRE (fig. 57 A). La expresión de DEC205 y MHC-II también era igual a la descrita en timos postnatales *NSG* de 3 días, expresándose ambos de forma generalizada por todo el epitelio excepto en las regiones Cld3/4+ (fig. 56 B, 57 B), y en el caso de DEC205 tampoco en las zonas adyacentes a éstas MTS10+ ni en la zona subcapsular (fig. 56 B). Por tanto, podía diferenciarse una corteza MHCII+DEC205+ externa a una región central MTS10+ que contenía las áreas centrales Cld3/4+, que en el caso de los timos *NSG* no expresaba ningún marcador funcional medular. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para timos *NSG* de la misma edad, además de la presencia de células CD80+MTS10- que corresponden presumiblemente a células dendríticas como en el caso de los timos *NSG*, observamos cierta regulación positiva del marcador medular CD80 por parte de las células MTS10+K5+ más apicales, situadas mayoritariamente en la zona troncal del timo aunque también en algunos focos más distales (fig. 57 A, C).

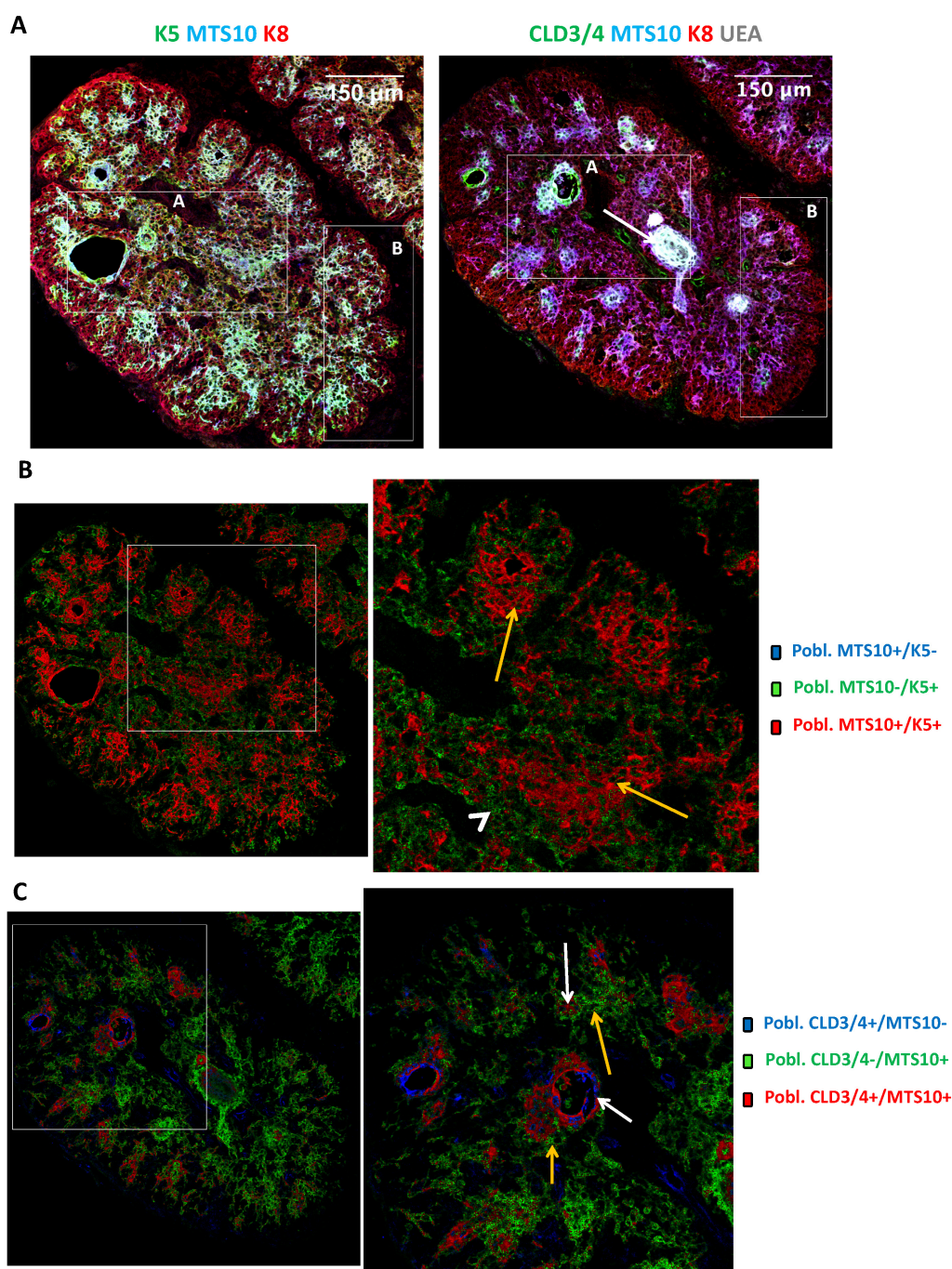


Figura 55. Los timos *Ikaros*^{-/-} postnatales de 3 días son, en general, iguales a los de ratones NSG de la misma edad, exhibiendo una zona troncal y otra distal. MTS10 y K5 muestran una expresión generalizada, mostrando en su parte central lúmenes y focos celulares *Cld3/4*⁺ que mayoritariamente expresan UEA. **A.** Criosecciones de 10 µm de timos *Ikaros*^{-/-} de 3 días postnatal, procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o *Cld3/4* (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B y C.** Colocalización de la expresión de MTS10 con K5 o *Cld3/4*, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10⁺/K5⁻ (ausente, azul), MTS10⁻/K5⁺ (verde) y MTS10⁺/K5⁺ (rojo) (**B**) y de las poblaciones *Cld3/4*⁺/MTS10⁻ (azul), *Cld3/4*⁻/MTS10⁺ (verde) y *Cld3/4*⁺/MTS10⁺ (rojo) (**C**). Se indica en **A** una zona troncal (zona A) y otra distal (zona B), observándose un marcaje central de K5 y MTS10, con algunas células también positivas hacia la región basal siendo todo el epitelio K8⁺. Las flechas blancas señalan la población celular apical K5⁺MTS10⁺/-*Cld3/4*⁺UEA⁺, englobada en la población más amplia K5⁺MTS10⁺*Cld3/4*⁻ (flechas amarillas), con presencia de células no apicales K5⁺MTS10⁻*Cld3/4*⁻ (cabeza de flecha).

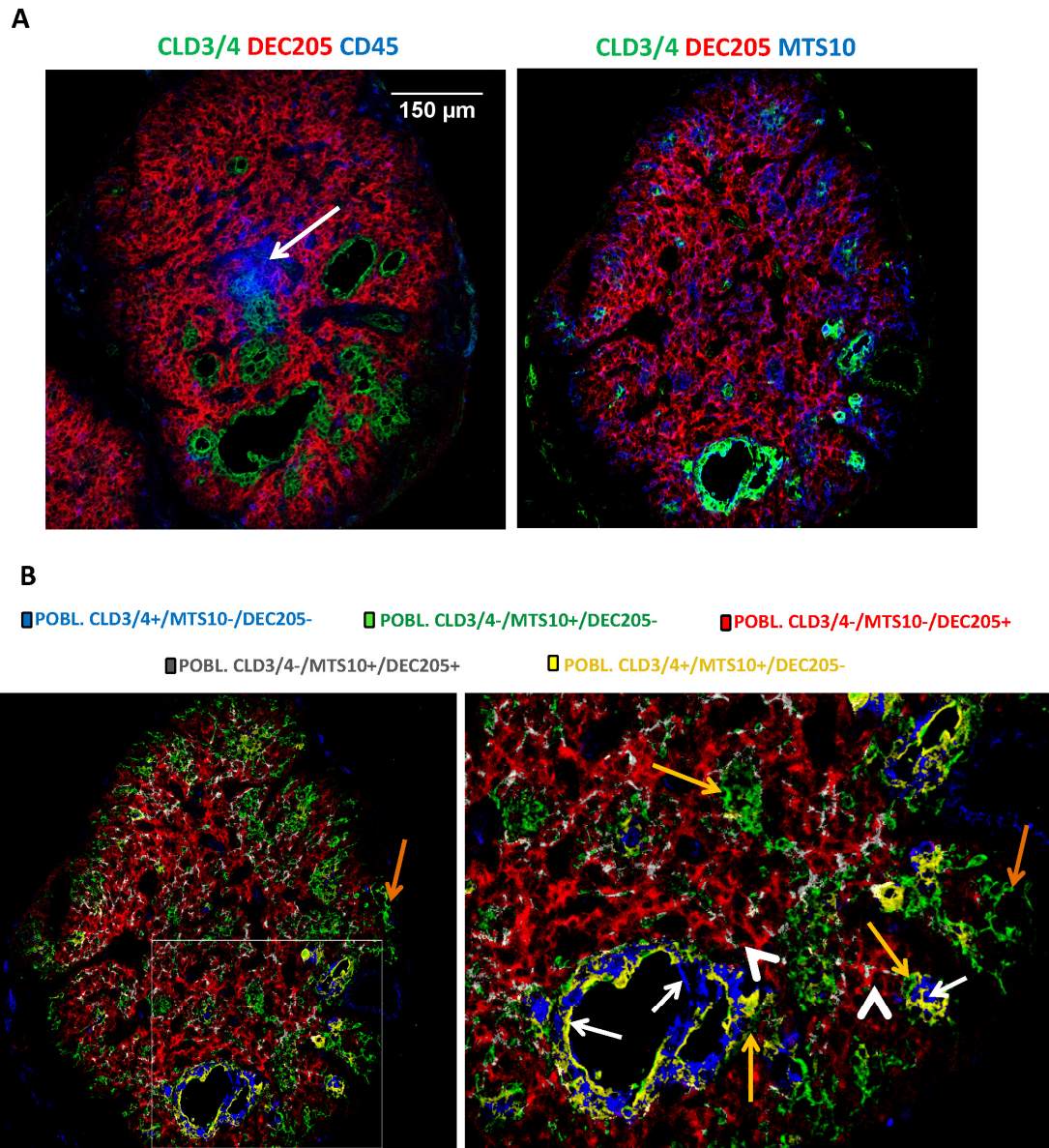


Figura 56. Inicio de la colonización linfoide en timos *lkaros* $-/-$ postnatales de 3 días. DEC205 se expresa en todo el epitelio excepto en las regiones *Cld3/4+*, las adyacentes a éstas *MTS10+* y la zona subcapsular. A. Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y CD45 (azul) o de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y MTS10 (azul). Se observan acúmulos de células CD45+ (flecha) en las regiones troncales del timo cerca de algunos lúmenes *Cld3/4+*. DEC205 no se expresa en las regiones *Cld3/4+* ni en su periferia *MTS10+*. B. Colocalización de las expresiones de DEC205, *Cld3/4* y MTS10. Se muestra una superposición de las poblaciones *Cld3/4+/MTS10-/DEC205-* (azul), *Cld3/4-/MTS10+/DEC205-* (verde), *Cld3/4-/MTS10-/DEC205+* (rojo), *Cld3/4-/MTS10+/DEC205+* (blanco) y *Cld3/4+/MTS10+/DEC205-* (amarillo). Las flechas blancas señalan la población apical *Cld3/4+/MTS10+/-/DEC205-*, las amarillas la población periférica a la anterior *Cld3/4-/MTS10+/DEC205-* y las cabezas de flecha la población aún más periférica hacia la basal *Cld3/4-/MTS10+/-/DEC205+*. DEC205 no se expresa en la zona subcapsular donde se observan células dispersas *MTS10+* (flechas naranjas).

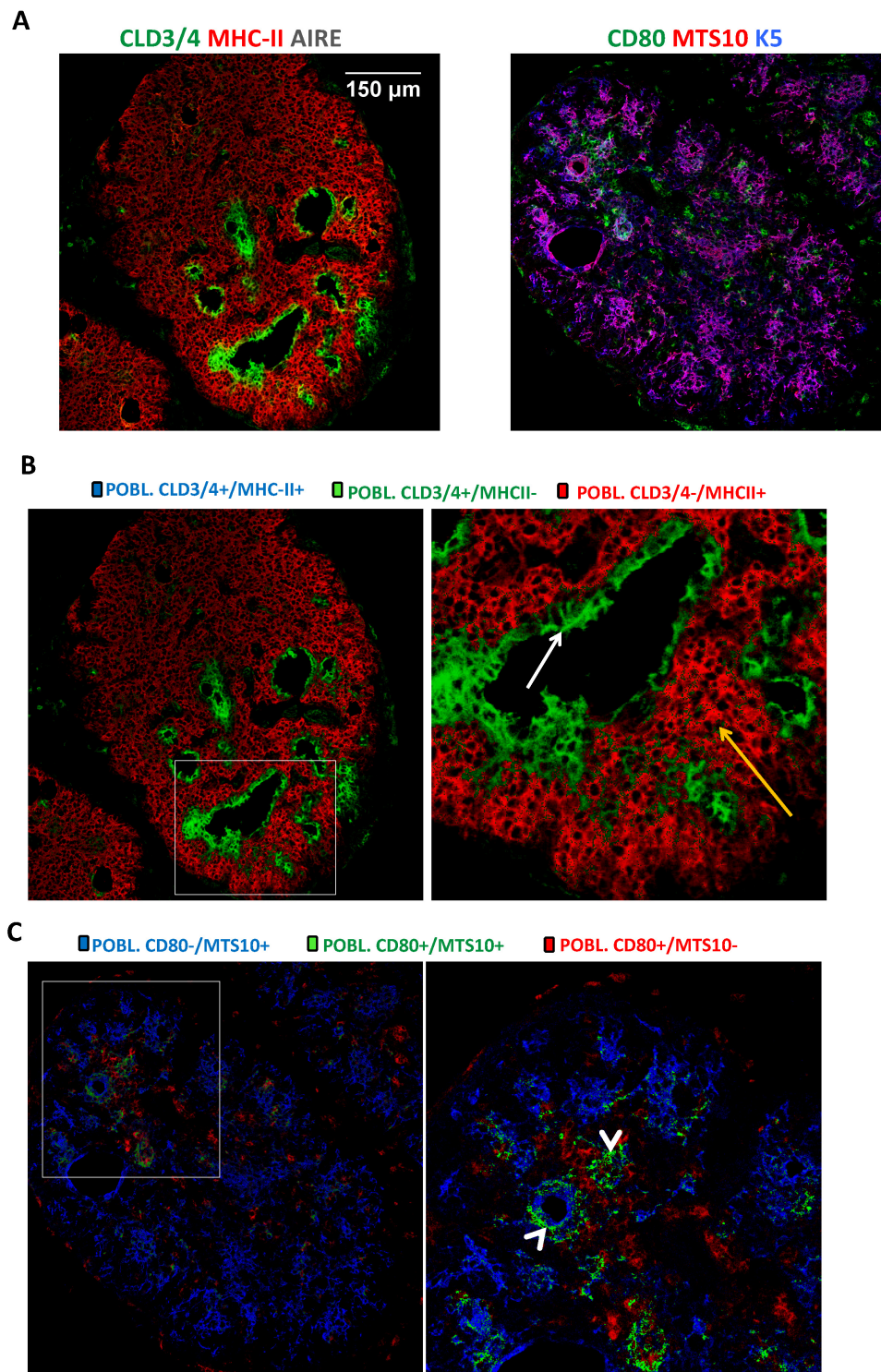


Figura 57. En timos *lkaros* $-/-$ postnatales de 3 días MHC-II se expresa en todo el epitelio excepto en las regiones *Cld3/4+*, no hay expresión de AIRE y aparece expresión de CD80+ en las células MTS10+K5+, principalmente de la zona troncal. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de MHC-II (rojo), *Cld3/4* (verde) y AIRE (ausente, blanco) o de CD80 (verde), MTS10 (rojo) y K5 (azul). Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. **B y C.** Superposición de las poblaciones *Cld3/4+/MHCII+* (ausente, azul), *Cld3/4+/MHCII-* (verde) y *Cld3/4-/MHCII+* (rojo) (**B**) o *CD80-/MTS10+* (azul), *CD80+/MTS10+* (verde) y *CD80+/MTS10-* (rojo) (**C**). Se observa expresión de MHC-II en todo el epitelio (flechas amarillas) excepto en las regiones *Cld3/4+* (flechas blancas). CD80 se expresa en algunas de las células MTS10+ más apicales (cabezas de flecha).

A 6 días postnatal el órgano había crecido y el epitelio se había expandido, pero no se observaban cambios en la estructura histológica definida por la expresión de K8, K5 y MTS10, que era en esencia la misma que la descrita para el estadio anterior y para los timos alinfoides postnatales *NSG* (fig. 58). El grado de colonización linfóide era mayor que en el estadio anterior, de manera que el órgano ya presentaba células CD45+ en su interior, en zonas corticales. MHC-II seguía expresándose por todo el epitelio excepto en las células medulares Cld3/4+ (fig. 59), que tampoco expresaban el regulador autoinmune AIRE (fig. 60 A). Sin embargo, a diferencia de los estadios anteriores, observamos que las células de la subcápsula tímica habían adquirido la expresión de DEC205 (fig. 60).

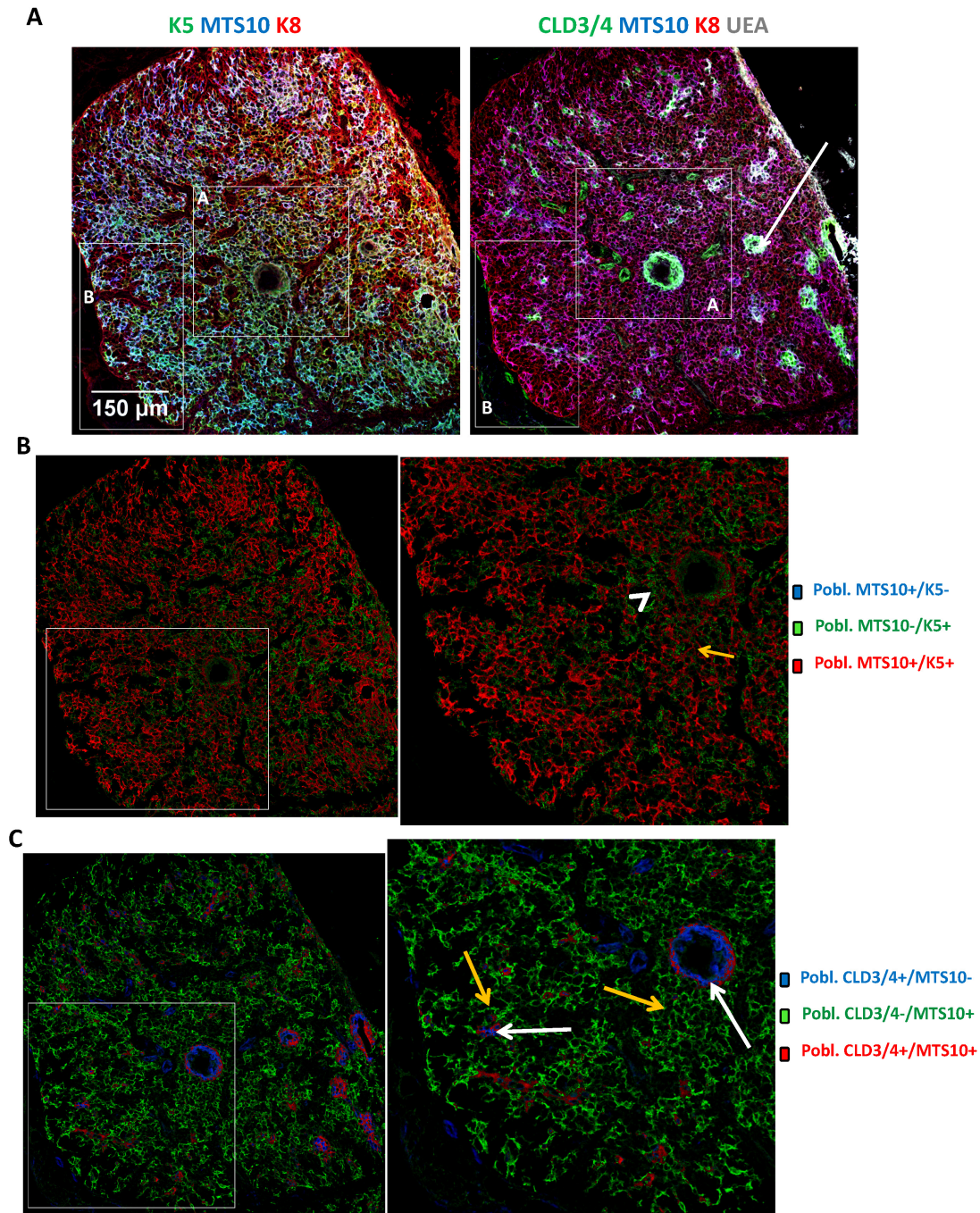


Figura 58. En timos Ikaros $-/-$ postnatales de 6 días MTS10 y K5 se expresan en la parte central, apical, incluyendo en las regiones más apicales células Cld3/4+UEA+ tanto en la zona troncal como en las distales. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. **B y C.** Superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) o Cld3/4+/MTS10- (azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo) (**C**). Se observa una zona troncal (zona A) y otra distal (zona B) donde los grupos o lúmenes Cld3/4+UEA+MTS10+/- (flechas blancas) están situados en la parte central de la población Cld3/4-/MTS10+/K5+ (flechas amarillas). Las cabezas de flecha señalan células K5+MTS10- dispersas en la periferia de la población anterior. Todo el epitelio es K8+.

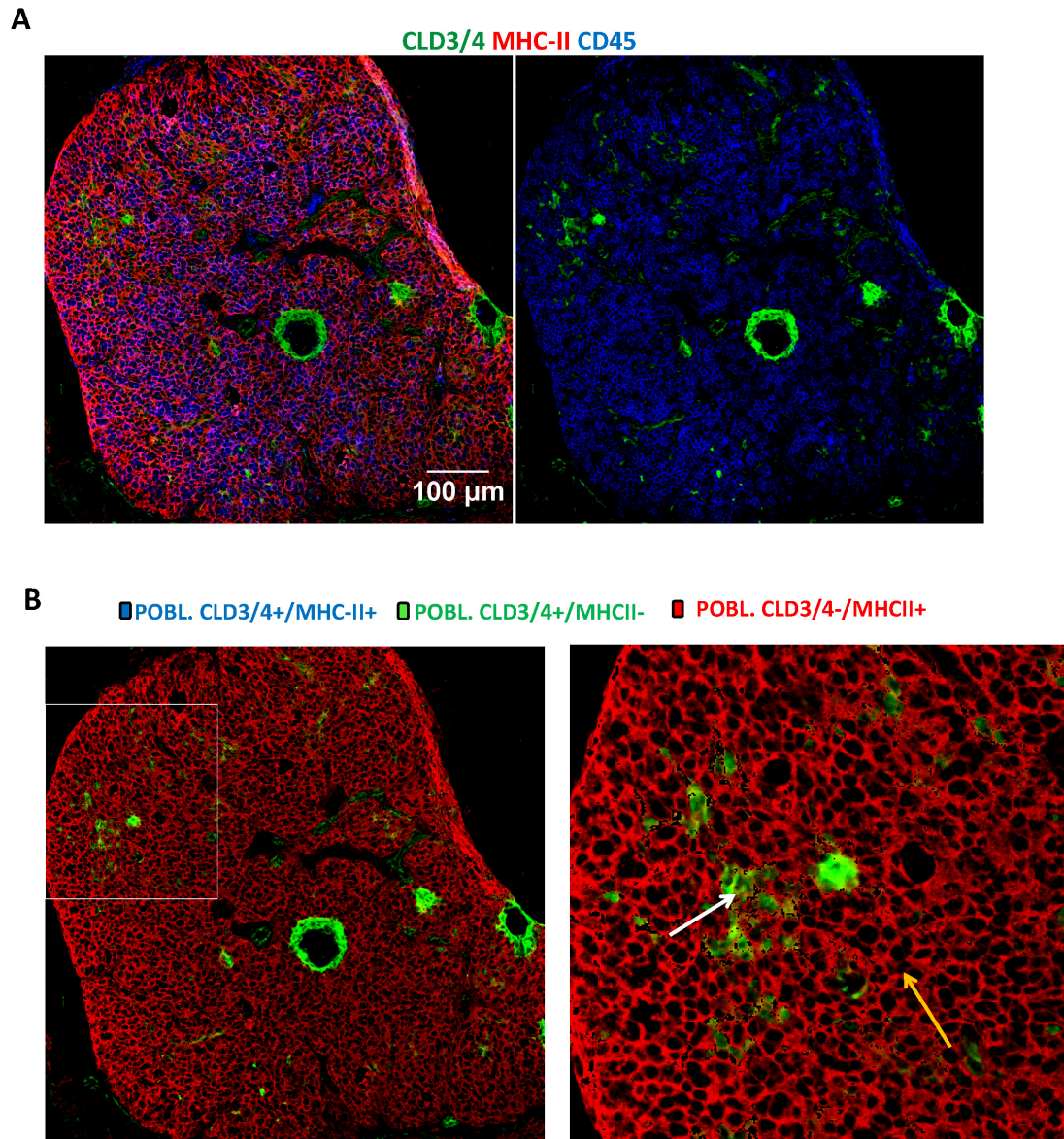


Figura 59. En timos *Ikaros*^{-/-} postnatales de 6 días las células linfoides se localizan en la región *Cld3/4*⁻ donde también se expresa MHC-II. Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de MHC-II (rojo), *Cld3/4* (verde) y CD45 (azul) (**A**) y superposición de las poblaciones *Cld3/4*⁺/MHCII⁺ (ausente, azul), *Cld3/4*⁺/MHCII⁻ (verde) y *Cld3/4*⁻/MHCII⁺ (rojo) (**B**). Se observan células CD45⁺ en regiones *Cld3/4*⁻. MHC-II (flechas amarillas) se expresa en todo el epitelio excepto en las zonas *Cld3/4*⁺ (flechas blancas).

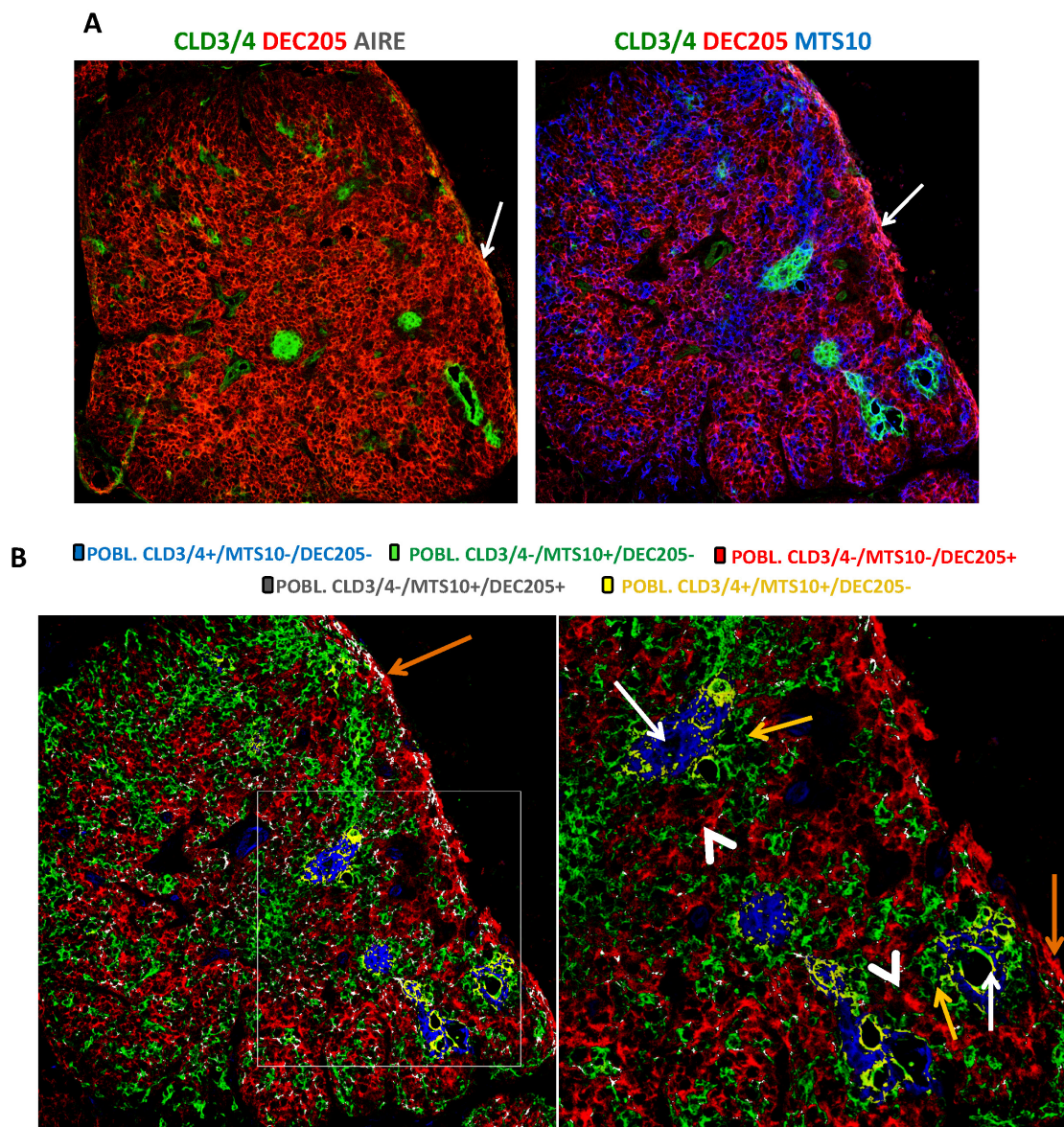


Figura 60. En timos *lkaros* $-/-$ postnatales de 6 días la expresión de DEC205 se extiende a la región subcapsular pero sigue sin expresarse AIRE. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y AIRE (ausente, blanco) o DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y MTS10 (azul). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. DEC205 se expresa en todo el epitelio, incluida la subcápsula (flechas), excepto en las regiones Cld3/4+ y su periferia MTS10+. No hay expresión de AIRE. **B.** Colocalización de las expresiones de DEC205, Cld3/4 y MTS10. Se muestra una superposición de las poblaciones Cld3/4+/MTS10-/DEC205- (azul), Cld3/4-/MTS10+/DEC205- (verde), Cld3/4-/MTS10-/DEC205+ (rojo), Cld3/4-/MTS10+/DEC205+ (blanco) y Cld3/4+/MTS10+/DEC205- (amarillo). Se observa una población apical Cld3/4+/MTS10+/-/DEC205- (flechas blancas), las regiones circundantes están constituidas por células Cld3/4-/MTS10+/DEC205- (flechas amarillas) y las capas circundantes a ambas Cld3/4-MTS10+/-/DEC205+ (cabezas de flecha). En la zona subcapsular se observa expresión de DEC205 (flechas naranjas).

A 7 días postnatal se producía la tridimensionalización del epitelio y la expansión de la corteza pero aún no de la médula. Además, había otra serie de modificaciones respecto a la condición de los timos *NSG* de la misma edad (ver fig. 51). Todo el epitelio era K8+ y la expresión de K5 estaba ampliamente extendida formando cordones celulares que se extendían hasta la subcápsula; sin embargo, a diferencia de lo que sucedía en los timos de ratones *NSG*, MTS10 se expresaba mucho menos en células con disposición radial en las zonas corticales, quedando mayoritariamente restringida su expresión a las regiones Cld3/4+UEA+ y a sus zonas adyacentes, y a algunas células MTS10+ dispersas en zonas subcapsulares (fig. 61). Estos resultados indicaban, por tanto, que la presencia de precursores linfoides reducía la expresión de MTS10 en el área cortical. Las células CD45+ estaban ampliamente distribuidas por todo el timo de manera que también se localizaban en zonas colindantes con las regiones medulares Cld3/4+ (fig. 62 A), a diferencia de lo que sucedía en el estadio anterior. A esta edad se observaba que todas las células Cld3/4+ regulaban positivamente la expresión de MHC-II, por lo que todo el epitelio era MHCII+ (fig. 62 B) y también la de la molécula coestimuladora CD80 que, además de en estas células Cld3/4+, se expresaba en sus zonas circundantes MTS10+ (fig. 62 C). Observábamos también la expresión por parte de algunas de las células Cld3/4+ del regulador autoinmune AIRE (fig. 63). Por tanto, a esta edad ya se iba definiendo un compartimento medular con capacidades funcionales como son la presentación antigénica (expresión de MHC-II) y la producción de autoantígenos (expresión de AIRE). Las capas que se extendían desde estas regiones hacia la basal, lo que serían la corteza interna y la subcápsula, quedaban definidas, al igual que en el estadio anterior, por la expresión de DEC205 y MHC-II, con presencia de algunas células dispersas MTS10+ (fig. 63).

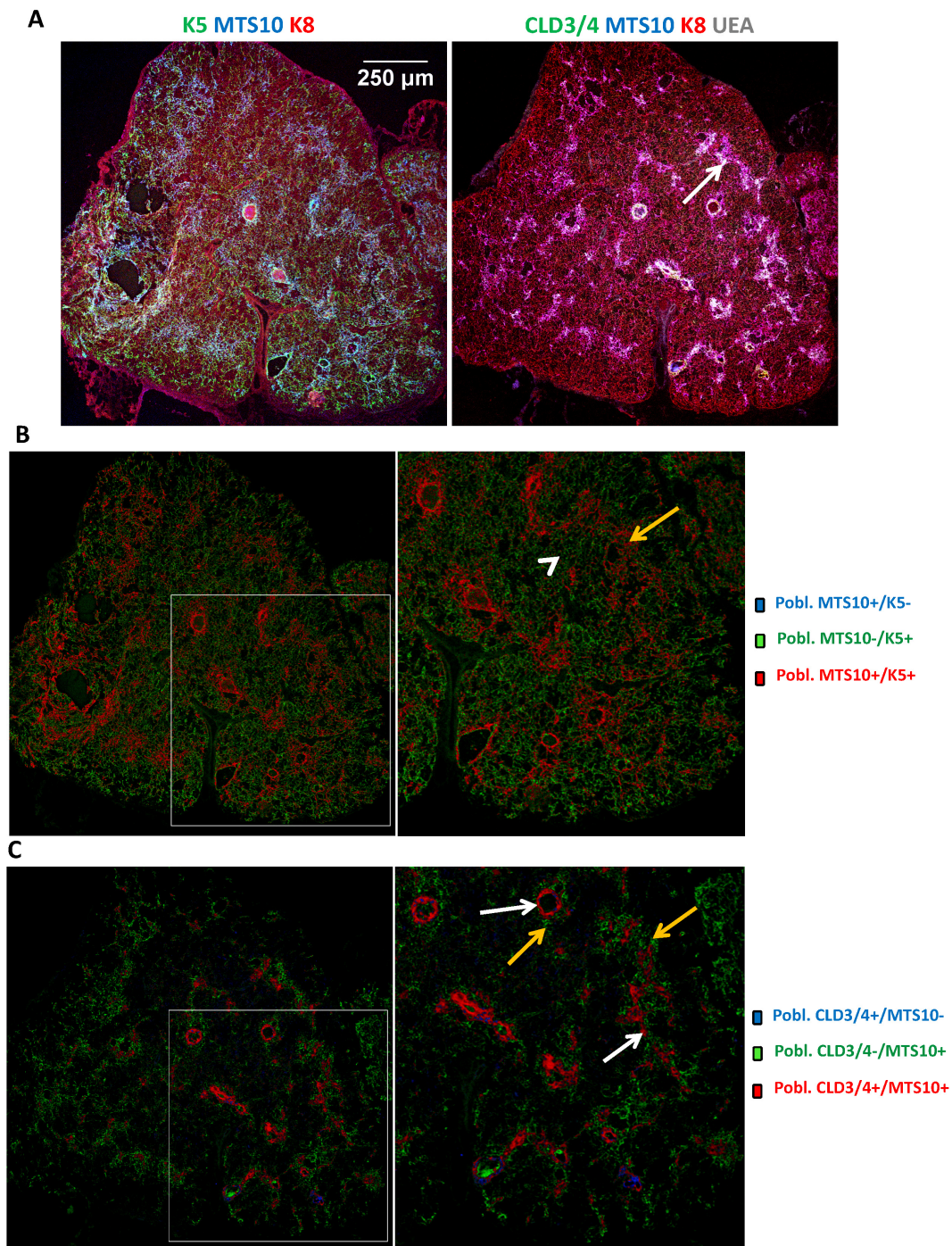


Figura 61. Timos Ikaros $-/-$ postnatales de 7 días: la expresión de K5 se extiende por la región MTS10-, quedando la de MTS10 asociada a las regiones Cld3/4+UEA+ y su periferia. Criosecciones de 10 µm procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o de Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV (**A**); y colocalización de la expresión de MTS10 con K5 o Cld3/4, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) y de las poblaciones Cld3/4+/MTS10- (azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo) (**C**). Todas las células MTS10+ y Cld3/4+ son también K5+. Las flechas blancas señalan la población apical MTS10+/-Cld3/4+UEA+, englobada en la población más amplia K5+MTS10+Cld3/4- (flechas amarillas), habiendo aumentado la expresión de K5, pero no la de MTS10, por el resto del epitelio (cabezas de flecha). Como en estadios anteriores todo el epitelio es K8+.

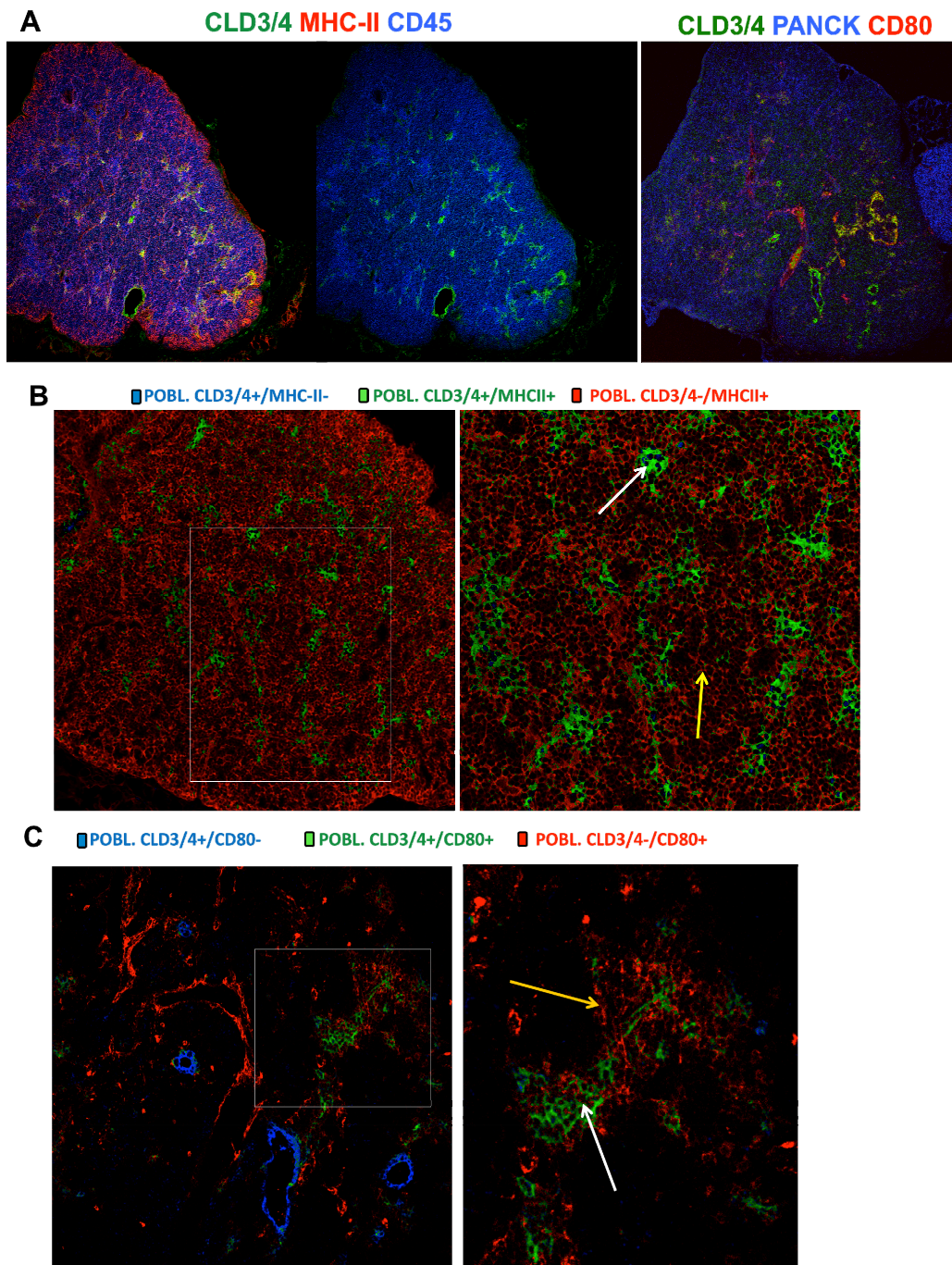


Figura 62. Timos postnatales de 7 días *Ikaros*^{-/-}: las células *CD45*⁺ se localizan en proximidad a las regiones *Cld3/4*⁺ que ahora expresan *MHC-II* y *CD80*, y su periferia *MTS10*⁺, *CD80*, contribuyendo a la definición de la región medular. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de *MHC-II* (rojo), *Cld3/4* (verde) y *CD45* (azul) o de *Cld3/4* (verde), pancitoqueratina (azul) y *CD80* (rojo). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observa un timo ampliamente colonizado por células linfoides, donde *MHC-II* se expresa por todo el epitelio y *CD80* en las regiones *Cld3/4*⁺. **B.** Colocalización de las expresiones de *MHC-II* y *Cld3/4*, donde se muestra una superposición de las poblaciones *Cld3/4*⁺/*MHCII*⁻ (ausente, azul), *Cld3/4*⁺/*MHCII*⁺ (verde) y *Cld3/4*⁻/*MHCII*⁺ (rojo). *MHC-II* se expresa por todo el epitelio (flechas amarillas), incluidas las células *Cld3/4*⁺ (flechas blancas). **C.** Colocalización de las expresiones de *Cld3/4* y *CD80*, donde se muestra una superposición de las poblaciones *Cld3/4*⁺/*CD80*⁻ (azul), *Cld3/4*⁺/*CD80*⁺ (verde) y *Cld3/4*⁻/*CD80*⁺ (rojo). La población *CD80*⁺ incluye a la *Cld3/4*⁺ (flechas blancas) y se expresa, además, en las regiones adyacentes a la mismas (flechas amarillas).

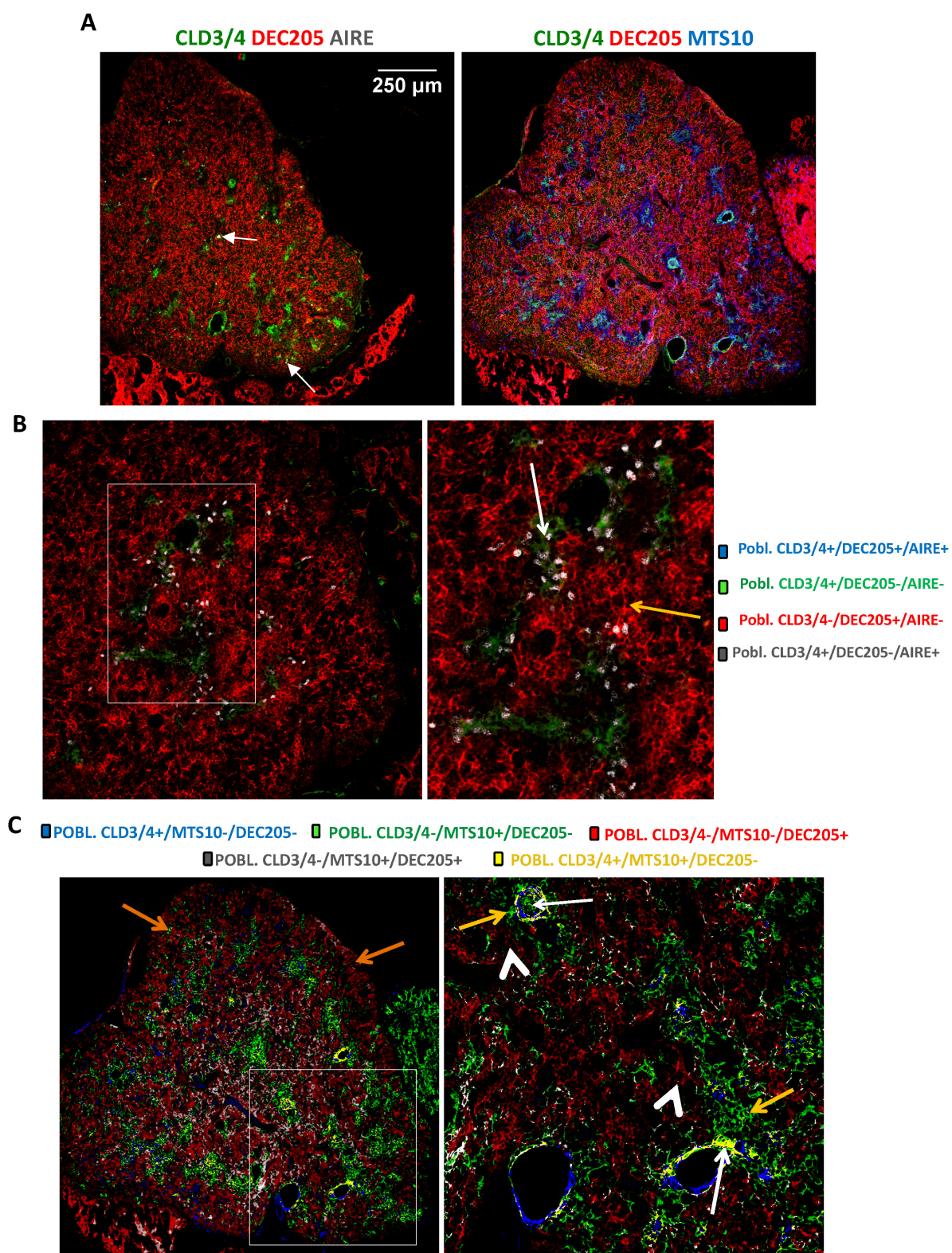


Figura 63. En timos *lkaros* $-/-$ postnatales de 7 días la expresión de DEC205 define la región cortical, esencialmente MTS10-, mientras la médula DEC205- es definida por las células *Cld3/4*+, que expresan AIRE, y su región adyacente MTS10+*Cld3/4*-. **A.** Criosecciones de 10 μm procesadas para inmunodetección de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y AIRE (blanco) o de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y MTS10 (azul). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. DEC205 se expresa en todo el epitelio excepto en las regiones *Cld3/4*+ y su periferia MTS10+. Un subset de células *Cld3/4*+ expresa AIRE (flechas). **B.**

Colocalización de las expresiones de DEC205, Cld3/4 y AIRE. Se muestra una superposición de las poblaciones Cld3/4+/DEC205+/AIRE+ (ausente, azul), Cld3/4+/DEC205-/AIRE- (verde), Cld3/4-/DEC205+/AIRE- (rojo) y Cld3/4+/DEC205-/AIRE+ (blanco). Las flechas blancas señalan células Cld3/4+ que expresan AIRE y las amarillas la población DEC205+ excluyente con la anterior. C. Se muestra una superposición de las poblaciones Cld3/4+/MTS10-/DEC205- (azul), Cld3/4-/MTS10+/DEC205- (verde), Cld3/4-/MTS10-/DEC205+ (rojo), Cld3/4-/MTS10+/DEC205+ (blanco) y Cld3/4+/MTS10+/DEC205- (amarillo). Las flechas blancas señalan la población apical Cld3/4+/MTS10+/-/DEC205-, las amarillas la población periférica a la anterior Cld3/4-/MTS10+/DEC205- y las cabezas de flecha la población periférica a éstas Cld3/4-/MTS10+/-/DEC205+. La subcápsula expresa DEC205 y se observa alguna célula dispersa MTS10+ (flechas naranjas).

Los timos *Ikaros* -/- de un mes de edad (figs. 64, 65) mostraban una estructura histológica y unas características funcionales prácticamente iguales a las descritas para timos postnatales de 7 días en los que la compartimentalización corteza/médula se hacía más evidente, ya que las áreas medulares se habían expandido y se asemejaban a las de timos *wt* (ver después). Esta expansión, que afectaba fundamentalmente a la población MTS10+Cld3/4-, implicaba, además, la tridimensionalización del epitelio con pérdida de estructuras lumbinales y alineamientos de las células Cld3/4+. A diferencia del timo *wt*, sin embargo, todo el epitelio era K5+K8+ igual que sucedía en timos adultos *NSG*. La médula estaba definida por la expresión de MTS10, MHC-II y, como hemos descrito para el estadio anterior, CD80, que en su parte central englobaba o incluía las células Cld3/4+UEA+, expresando algunas de éstas AIRE; y la corteza en la periferia hacia la basal de estas zonas, por la expresión de DEC205 y MHC-II (fig. 64, 65).

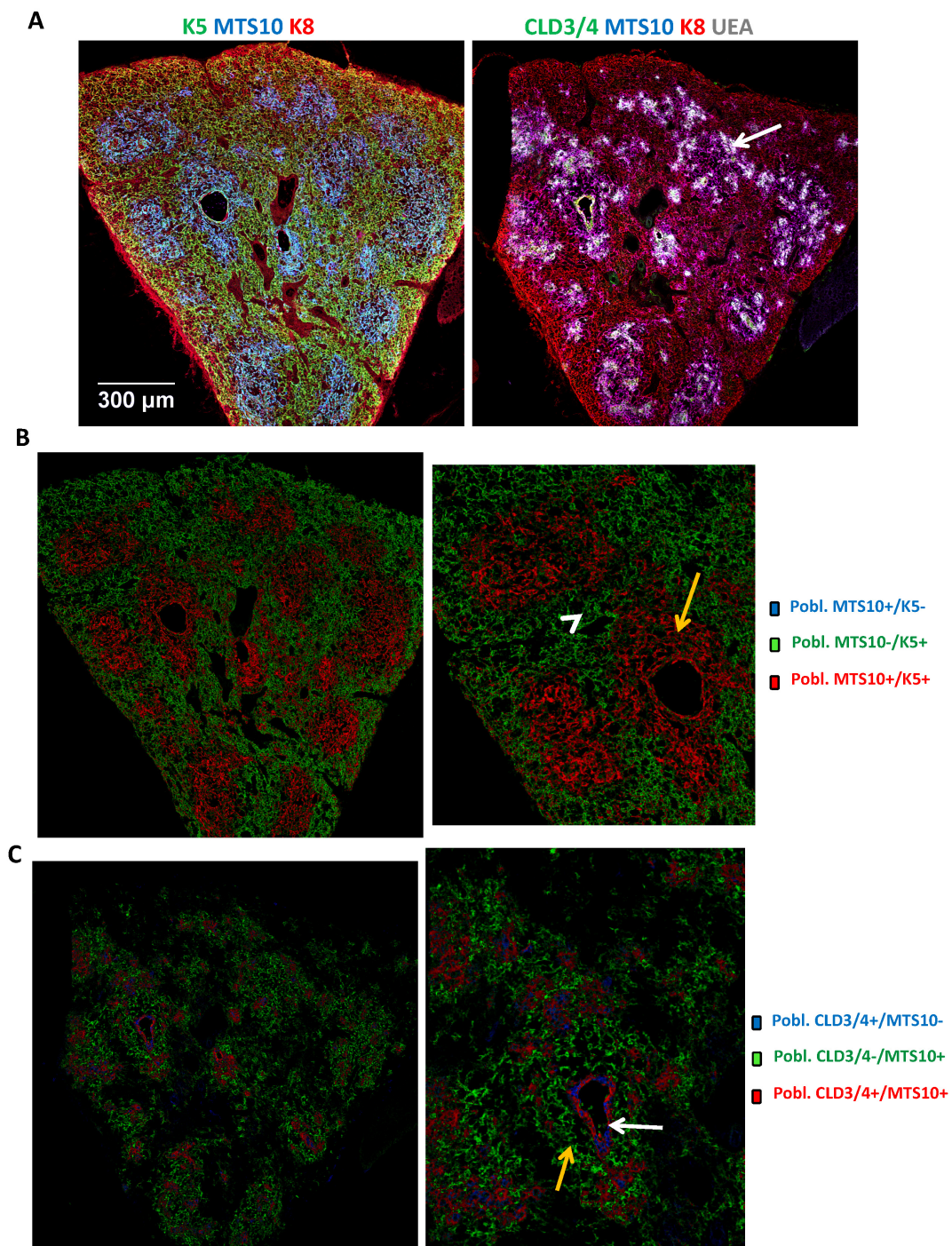


Figura 64. Los timos *Ikaros*^{-/-} de un mes muestran compartimentos corticales y medulares expandidos, este último definido por la expresión de MTS10 y *Cld3/4*, correspondiendo el resto del epitelio con la corteza, aunque todo el epitelio es K5+K8+. **A.** Criosecciones de 10 µm de timos de 1 mes, procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o de *Cld3/4* (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. **B y C.** Colocalización de la expresión de MTS10 con K5 o *Cld3/4*, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) y de las poblaciones *Cld3/4*+/MTS10- (azul), *Cld3/4*-/MTS10+ (verde) y *Cld3/4*+/MTS10+ (rojo) (**C**). Todas las células MTS10+ y *Cld3/4*+ son también K5+. Las médulas están definidas por una población central *Cld3/4*+UEA+MTS10+/- (flechas blancas) situadas en la región central de la población *Cld3/4*-MTS10+K5+ (flechas amarillas), todo ello englobado en la población más amplia K5+MTS10-*Cld3/4*- (cabezas de flecha) que supone el resto del epitelio y define la corteza junto con la expresión de K8.

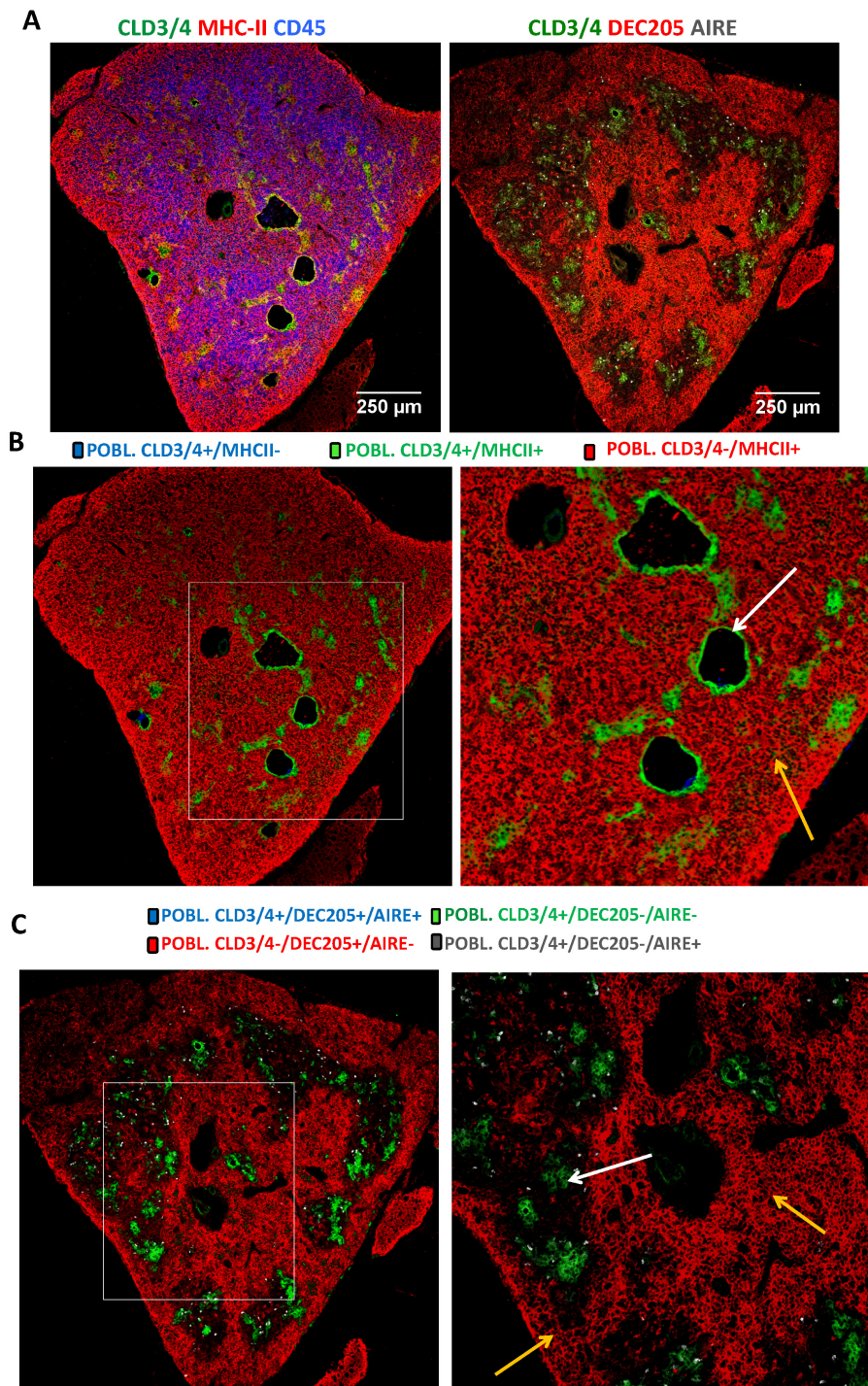


Figura 65. Corteza y médula de timos Ikaros $-/-$ de un mes: expresión de MHC-II, AIRE y DEC205. **A.** Criosecciones de 10 μ m de timos de 1 mes, procesados para inmunodetección de MHC-II (rojo), Cld3/4 (verde) y CD45 (azul) o de DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y AIRE (blanco) analizadas por microscopía confocal con un objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. **B.** Superposición de las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (ausente, azul), Cld3/4+/MHCII+ (verde) y Cld3/4-/MHCII+ (rojo). Todas las células Cld3/4+ son también MHCII+ (flecha blanca), expresándose además MHC-II en el resto del epitelio (flecha amarilla). **C.** Superposición de las poblaciones Cld3/4+/DEC205+/AIRE+ (ausente, azul), Cld3/4+/DEC205-/AIRE- (verde), Cld3/4-/DEC205+/AIRE- (rojo) y Cld3/4+/DEC205-/AIRE+ (blanco). La corteza DEC205+ (flechas amarillas) y la región medular Cld3/4+ y su periferia (flecha blanca) son excluyentes, estando nítidamente separadas. Se observa expresión de AIRE en algunas de las células Cld3/4+ (blanco).

En resumen, estos resultados indicaban que:

- 1) Las células que alcanzarán fenotipo funcional medular correspondían a aquellas situadas en las regiones centrales de las lobulaciones, que siguiendo un programa genético para la formación de lumen bloqueado por la expresión de FoxN1, inician, pero no completan, la diferenciación apical, regulando positivamente la expresión de Cld3/4 y MTS10 en las primeras etapas del desarrollo y solamente la de MTS10 al final del mismo. Por el contrario, aquellas células que no iniciaban la diferenciación apical debido al bloqueo de la misma por la expresión de FoxN1 darán lugar al epitelio cortical.
- 2) El compromiso a linaje cortical y la expresión de moléculas de MHC-II, indicativa de la capacidad de procesamiento y presentación de antígenos tanto en la corteza como en la médula, a excepción de las células Cld3/4+, dependía de la expresión de FoxN1 pero no de la colonización linfoide.
- 3) En los timos alinfoides *NSG* e *Ikaros* $-/-$ prenatales y *NSG* postnatales se observaba expresión de DEC205 y MHC-II en la corteza, a excepción de la zona subcapsular, indicando que la diferenciación funcional cortical era dependiente de la expresión de FoxN1 e independiente de linfocitos; aunque estos últimos son necesarios para la diferenciación de la región subcapsular.
- 4) Sin embargo, la expresión de CD80 y AIRE en el epitelio medular, y por tanto, su capacidad de presentar antígenos y la expresión promiscua de antígenos titulares propios, respectivamente, eran dependientes de la presencia de células de origen linfoide en el timo. CD80 aparecía con la llegada de los primeros linfocitos. Más tarde, cuando presumiblemente algunas células entraban en contacto con ellos, aparecía la expresión de MHC-II y AIRE en las células Cld3/4+.
- 5) Al menos gran parte de las células medulares provenían de células DEC205+ que, durante el desarrollo, regulaban positivamente la expresión de MTS10 y negativamente la de DEC205.
- 6) Finalmente, las células linfoides inducían la tridimensionalización del epitelio, y con ello, la expansión de la población epitelial medular MTS10+Cld3/4-.

4. Desarrollo del epitelio tímico en condiciones normales: Estudio de ratones *wildtype*.

Los datos hasta aquí presentados demostraban que la acción de FoxN1, inhibiendo un programa base de morfogénesis ramificada y formación de lumen daba lugar a una distribución epitelial que permitía, en presencia de células linfoides, la diferenciación corteza/médula. Estos resultados describían la acción de las células linfoides sobre la estructura y diferenciación de un timo alinfoide FoxN1 +/+, cuya organización habíamos basado a su vez en la de los timos *Nude* (FoxN1 -/-), permitiendo la determinación de la acción secuencial de diferentes señales. Ahora analizaremos comparativamente estos resultados con la maduración ontogenética de timos *wildtype*, en los que la acción de FoxN1 y la presencia de células linfoides tiene lugar simultáneamente y no de manera secuencial como en los timos postnatales de ratones *Ikaros* -/-.

4.1. La estructura histológica córtico/medular de los timos *wildtype*, responde a un patrón de morfogénesis ramificada, y la adquisición de funcionalidad medular ocurre durante el periodo fetal como la observada en timos alinfoides colonizados postnatalmente.

Analizamos, al igual que en los casos anteriores, la expresión mediante inmunomarcaje de K5, K8, MTS10, UEA y Cld3/4 durante el desarrollo fetal y postnatal de timos *wildtype*, así como la expresión de los marcadores utilizados para evidenciar el fenotipo funcional del epitelio tímico.

Como ya había sido descrito por nuestro grupo (Muñoz y cols., 2014) a 12,5 dpc. el primordio tímico *wt* mostraba una estructura esencialmente igual a la observada en timos fetales tempranos *NSG* y *Nude* (ver figs. 24-26, 42), consistente en un lóbulo fusiforme uniformemente K8+, cuya zona central Cld3/4+ mostraba una estructura ramificada que expresaba en la zona troncal MTS10, coincidiendo la expresión de K5 con la de ambos pero definiendo un área mayor que éstos. En las zonas más distales las células expresaban Cld3/4 y K5 pero no MTS10 (fig. 66).

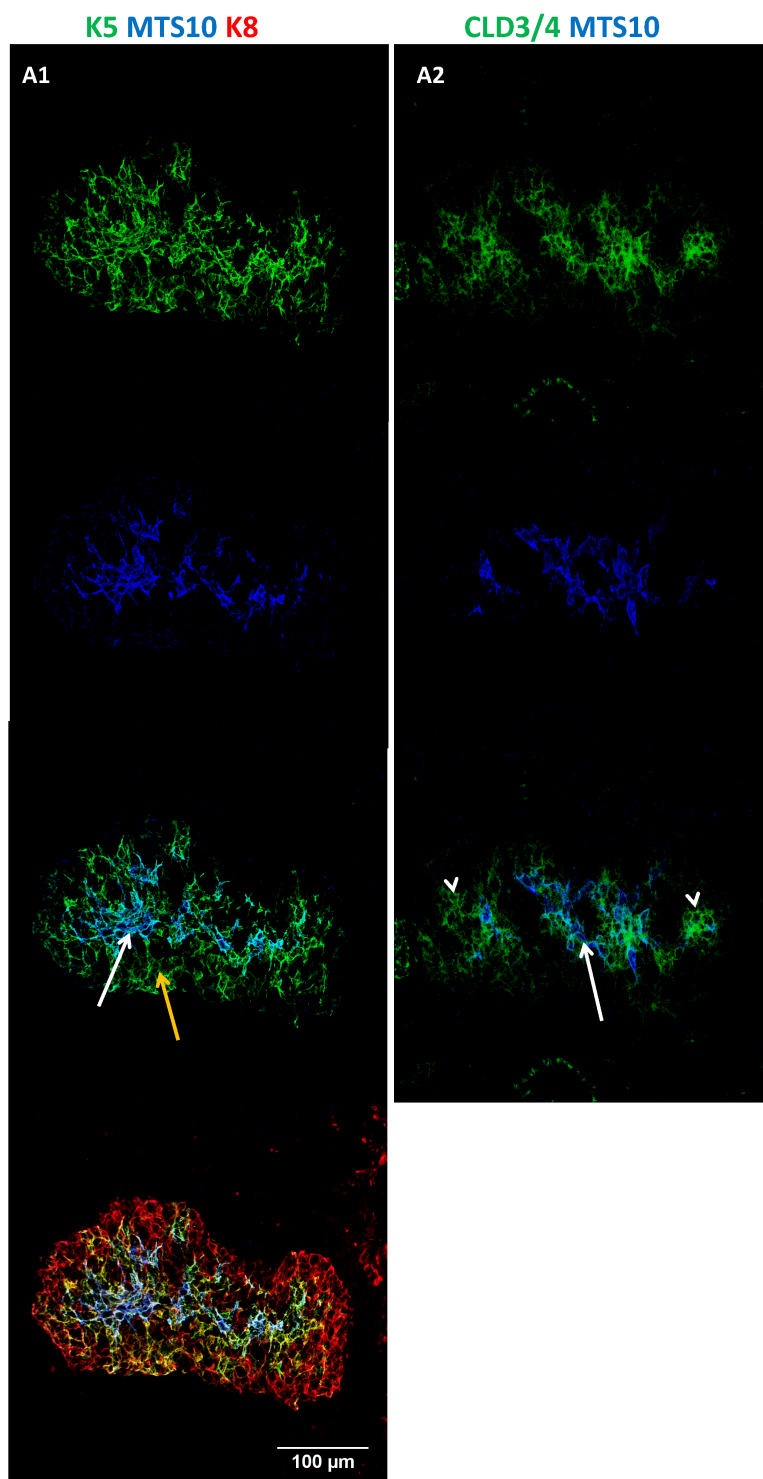


Figura 66. En timos wildtype de 12,5 dpc. MTS10 y Cld3/4 se expresan con un patrón continuo y ramificado en la zona central de la región K5+. **A.** Criosecciones de 10 µm de timos de 12,5 dpc. wildtype, procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A1**) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) (**A2**). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Todo el epitelio es K8+. Las flechas blancas señalan la población ramificada y central Cld3/4+MTS10+K5+. Las cabezas de flechas señalan extremos de las ramificaciones de la región Cld3/4+ que no expresan MTS10. Las flechas amarillas señalan la región central algo más amplia que rodea a la anterior K5+Cld3/4-MTS10-.

A 13,5 dpc. el patrón descrito se mantenía, pero el grado de ramificación de la estructura central Cld3/4+MTS10+K5+ era algo mayor que en el estadio anterior y que en timos alinoides tempranos (fig. 67, comparar con fig. 42). A esta edad había ya numerosas células CD45+ en el interior del timo y a diferencia de lo observado en los timos alinoides, tanto las células Cld3/4+ como las adyacentes a éstas expresaban MHC-II, salvo en las zonas más distales donde los focos Cld3/4+ eran MHCII- (fig. 68 A, B). DEC205 se expresaba por todo el epitelio a excepción de las regiones Cld3/4+, pero no se observaba aún expresión de AIRE (fig. 68 A, C).

A 14,5 dpc. (fig. 69, 70) este patrón histológico y funcional era en esencia el mismo, pero con algunas modificaciones. Por un lado, el marcador MTS10 se expresaba en un área mayor de la región K5+, aunque se seguían observando células K5+MTS10-; por otro lado, aparecía expresión de UEA en las células Cld3/4+ más polarizadas (fig. 69), lo que indicaba que las células de la zona central adquirirían primero la expresión de K5 y luego la de MTS10.

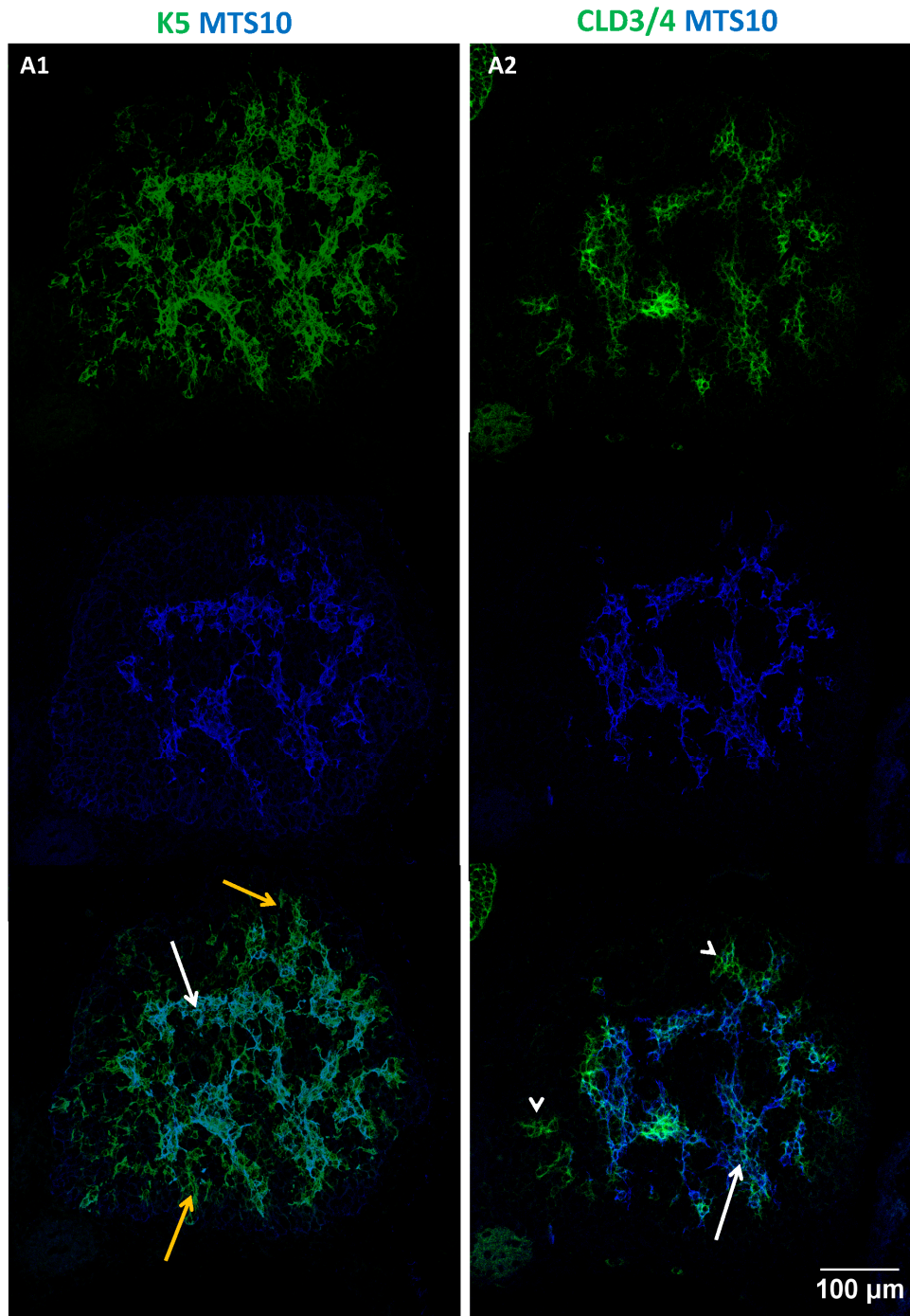


Figura 67. En timos wildtype de 13,5 dpc. MTS10 y Cld3/4 se expresan en la zona central de la región K5+, mientras que los extremos de las ramificaciones expresan Cld3/4 y K5 pero no MTS10. Crio-secciones de 10 μ m de timos wildtype de 13,5 dpc. procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) (A1) o de Cld3/4 (verde) y MTS10 (azul) (A2). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observa una población ramificada y continua Cld3/4+MTS10+K5+ (flechas blancas) situada en la parte central de la población también ramificada y algo más amplia K5+MTS10-Cld3/4- (flechas amarillas). Los extremos de las ramificaciones Cld3/4+ son MTS10- (cabezas de flecha).

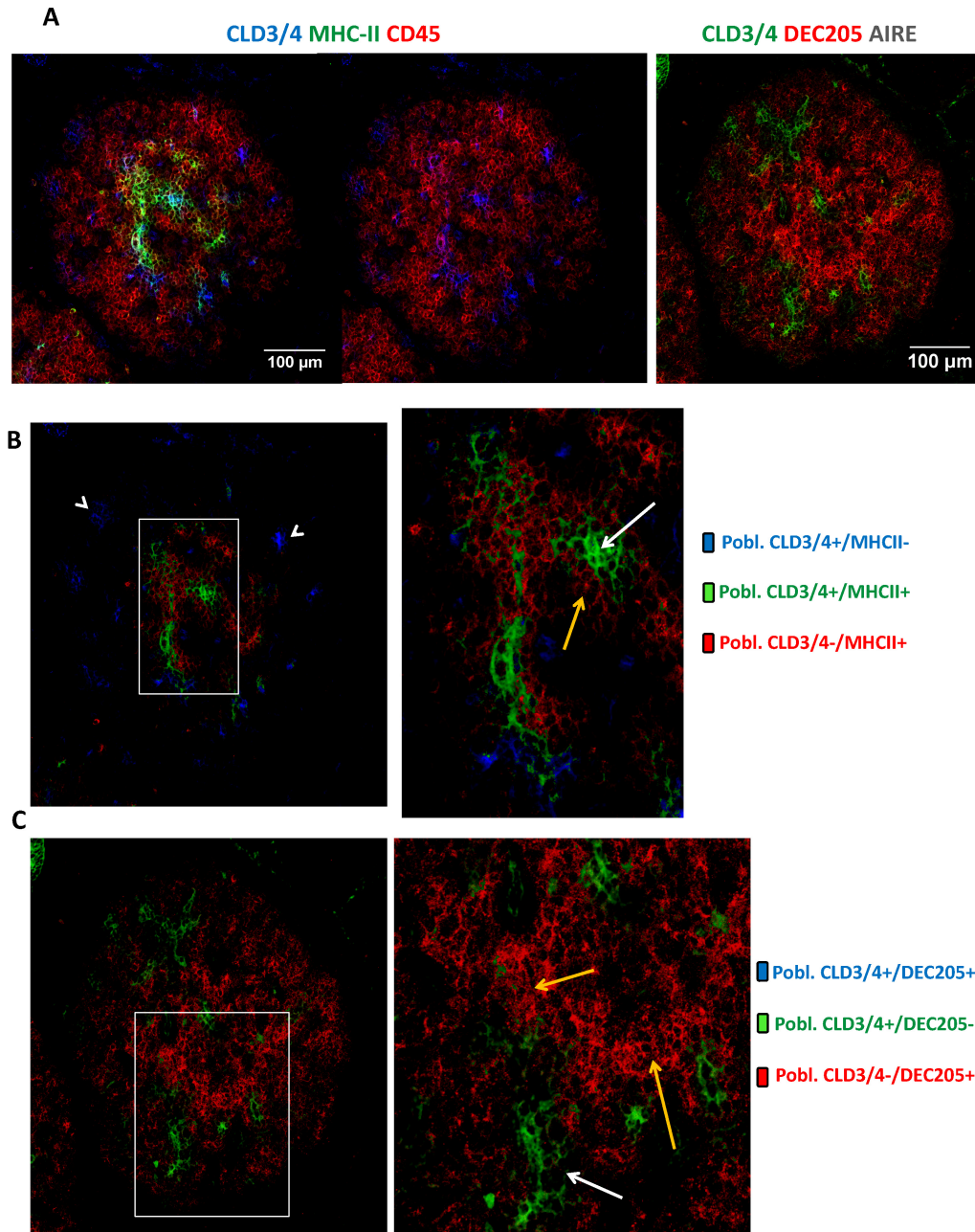


Figura 68. En timos wildtype de 13,5 dpc. MHC-II se expresa en la zona central de la región *Cld3/4+* y su periferia, en contacto con células *CD45+*, mientras que *DEC205* se expresa en toda la región *Cld3/4-* y no hay aún expresión de *AIRE*. **A.** Criosecciones de 10 μm de timos de 13,5 dpc. wildtype, procesados para inmunodetección de MHC-II (verde), *Cld3/4* (azul) y *CD45* (rojo) o de *DEC205* (rojo), *Cld3/4* (verde) y *AIRE* (ausente, blanco). Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observan células *CD45+* en regiones colindantes con las células *Cld3/4+*, detectándose expresión de MHC-II en estas regiones y de *DEC205* en todo el epitelio excepto en las regiones *Cld3/4+*, mientras que no se observa expresión de *AIRE*. **B.** Colocalización de la expresión de MHC-II y *Cld3/4*, donde se observa la superposición de las poblaciones *Cld3/4+/MHCII-* (azul), *Cld3/4+/MHCII+* (verde) y *Cld3/4-/MHCII+* (rojo) y un detalle (zona enmarcada). MHC-II se expresa coincidiendo con las zonas centrales *Cld3/4+* (flecha blanca) y en su periferia *Cld3/4-* (flecha amarilla). Las regiones más distales *Cld3/4+* son *MHCII-* (cabezas de flecha). **C.** Colocalización de la expresión de *DEC205* y *Cld3/4* donde se superponen las poblaciones *Cld3/4+/DEC205+* (ausente, azul), *Cld3/4+/DEC205-* (verde) y *Cld3/4-/DEC205+* (rojo) y se muestra un detalle (enmarcado). La expresión de *DEC205* (flechas amarillas) y la de *Cld3/4* (flecha blanca) son excluyentes entre sí.

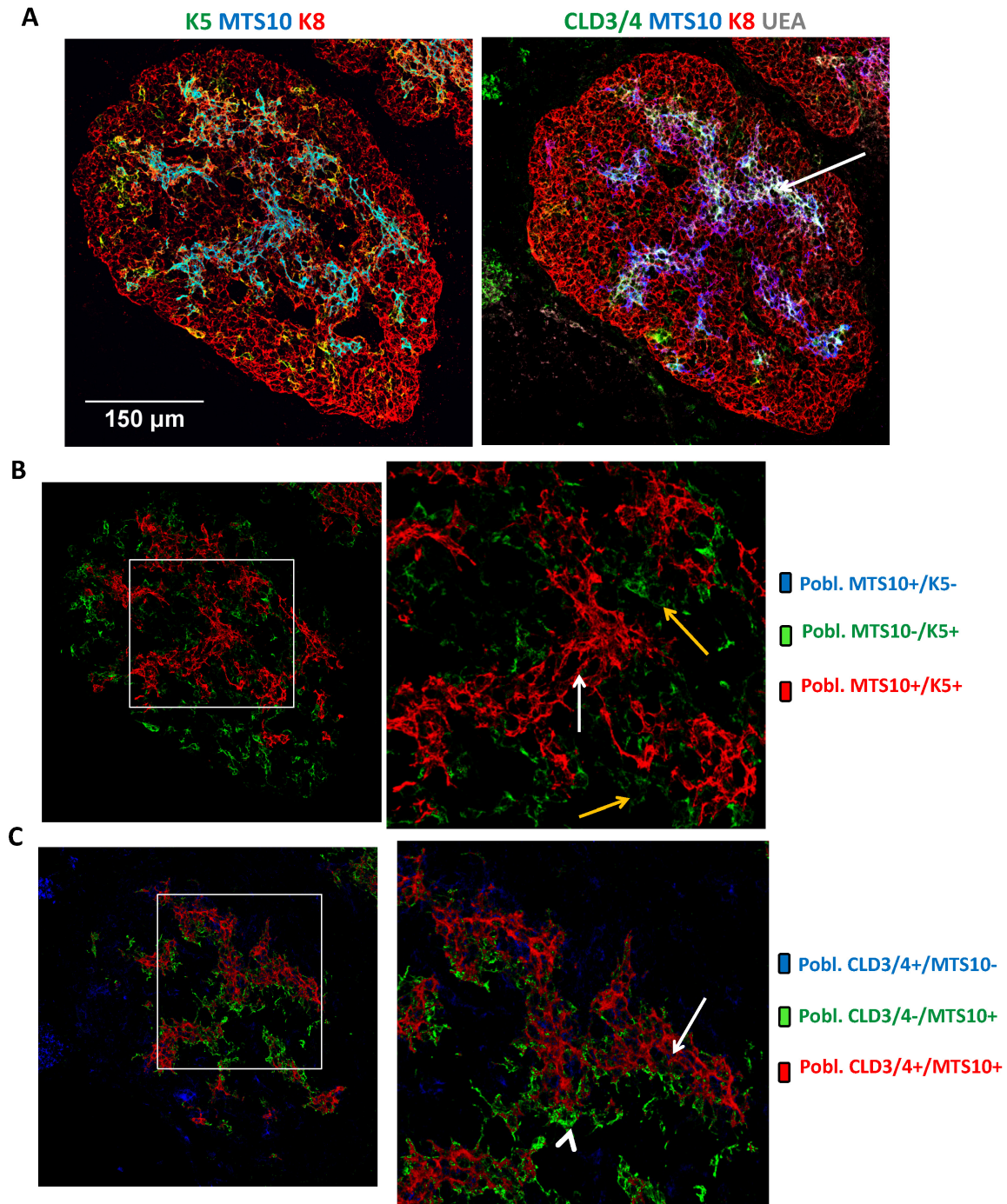


Figura 69. En timos wildtype de 14,5 dpc. MTS10 y Cld3/4 se expresan de acuerdo a un patrón ramificado en la zona central de la región K5+, suponiendo MTS10 una región más amplia de la población K5+ que en el estadio anterior. Algunas células Cld3/4+ expresan UEA. **A.** Criosecciones de 10 µm procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o de Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO Ibd.BL 20.0x0.70 IMM. MTS10, Cld3/4 y K5 definen una estructura ramificada en el interior de un lóbulo fusiforme donde todo el epitelio es K8+. Algunas de las células Cld3/4+ expresan UEA (flecha). **B y C.** Colocalización de las expresiones de MTS10 con K5 o Cld3/4, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) y de las poblaciones Cld3/4+/MTS10- (azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo) (**C**). Las flechas blancas señalan la población central K5+/MTS10+/Cld3/4+ y las amarillas la población periférica a ésta K5+/Cld3/4-/MTS10-, que presenta algunas células dispersas MTS10+/Cld3/4- (cabeza de flecha).

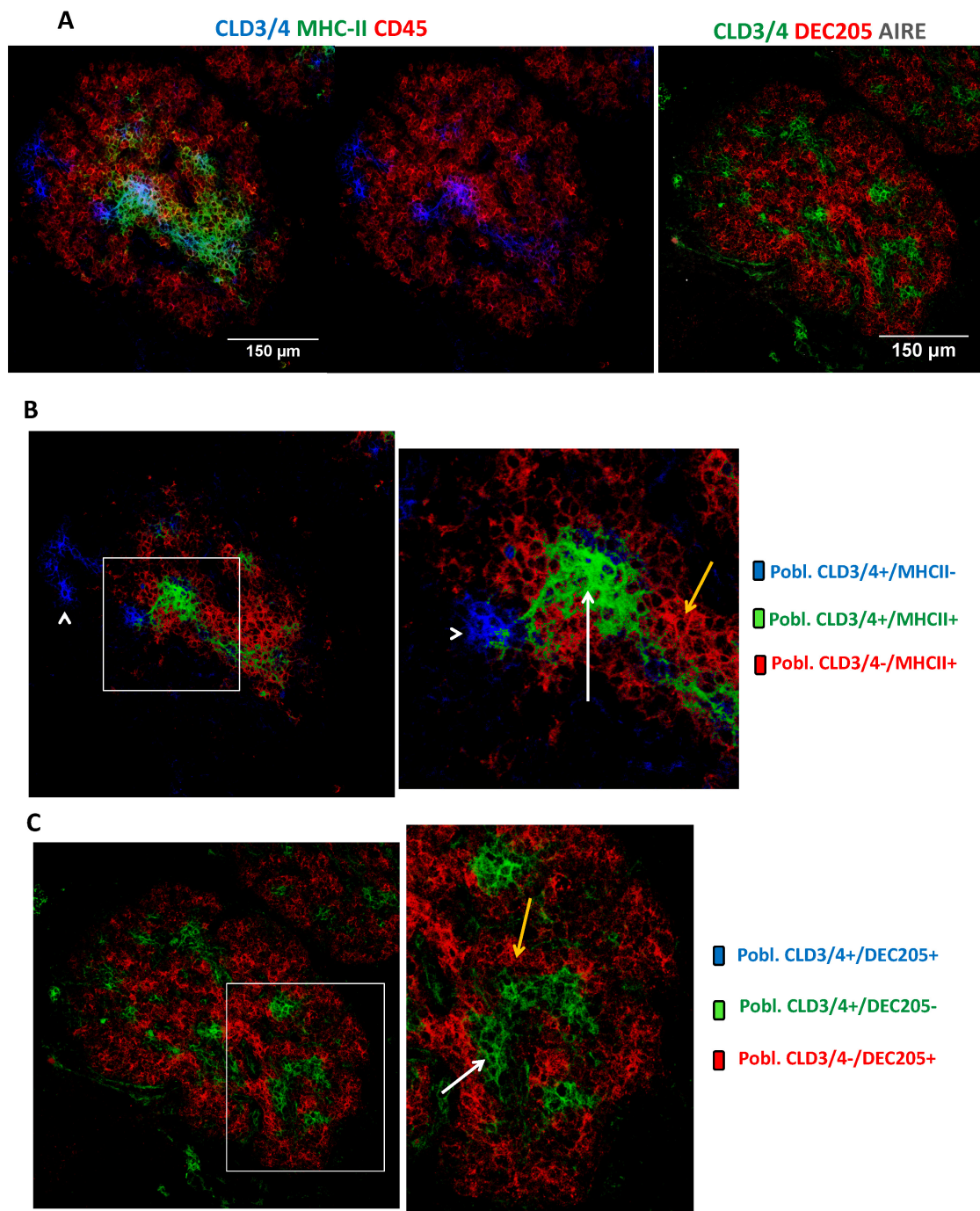


Figura 70. En timos wildtype de 14,5 dpc. MHC-II se expresa en la región central *Cld3/4+* y su periferia, en contacto con células *CD45+* y *DEC205* en la región *Cld3/4-*. **A.** Criosecciones de 10 μm procesados para inmunodetección de MHC-II (verde), *Cld3/4* (azul) y *CD45* (rojo) o de *DEC205* (rojo), *Cld3/4* (verde) y *AIRE* (ausente, blanco). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. Se observan células *CD45+* en regiones colindantes con el marcaje de *Cld3/4*, expresándose MHC-II en estas regiones centrales *Cld3/4+* y su periferia y *DEC205* en toda la región *Cld3/4-*. No hay expresión de *AIRE*. **B.** Colocalización de las expresiones de MHC-II y *Cld3/4*, donde se superponen las poblaciones *Cld3/4+/MHCII-* (azul), la *Cld3/4+/MHCII+* (verde) y la *Cld3/4-/MHCII+* (rojo). MHC-II se expresa en todas las células centrales *Cld3/4+* (flecha blanca) y su periferia *Cld3/4-* (flecha amarilla). Las zonas distales *Cld3/4+* no expresan MHC-II (cabezas de flecha). **C.** Colocalización de las expresiones de *DEC205* y *Cld3/4*, donde se muestra la superposición de las poblaciones *Cld3/4+/DEC205+* (ausente, azul), *Cld3/4+/DEC205-* (verde) y *Cld3/4-/DEC205+* (rojo). *DEC205* (flecha amarilla) se expresa por todo el epitelio excepto en las regiones *Cld3/4+* (flecha blanca).

A 15,5 dpc. se observaba un timo comparable tanto histológica como funcionalmente al descrito para timos postnatales *Ikaros* $-/-$ de 7 días tras su colonización linfoide (ver figs. 61-63). La estructura y distribución topológica de los marcadores estudiados resultó similar a lo que observábamos en éstos, con una expansión de la zona cortical aunque, notablemente, en timos *wt* no todo el epitelio era K5+K8+ (fig. 71 A). Por otro lado, la expresión de K5 permanecía asociada a la de MTS10 y Cld3/4, aunque ocupaba un área mayor, identificándose células K5+MTS10- dispersas en zonas basales y subcapsulares. La expresión de MTS10 también ocupaba una región ligeramente mayor que la Cld3/4+, de forma que ésta, que generalmente expresaba UEA, quedaba incluida o englobada dentro de la región MTS10+K5+ (fig. 71). MHC-II ya no se expresaba únicamente en las células de las regiones centrales Cld3/4+ y su periferia sino que a esta edad se había extendido por todo el epitelio. Por otro lado, en este estadio se observaba expresión de AIRE por primera vez en el timo fetal *wt* asociada a algunas células apicales Cld3/4+MHC-II+ (fig. 72 A, B). DEC205, al igual que en los estadios anteriores, se expresaba por toda la región Cld3/4- (fig. 72 A, C).

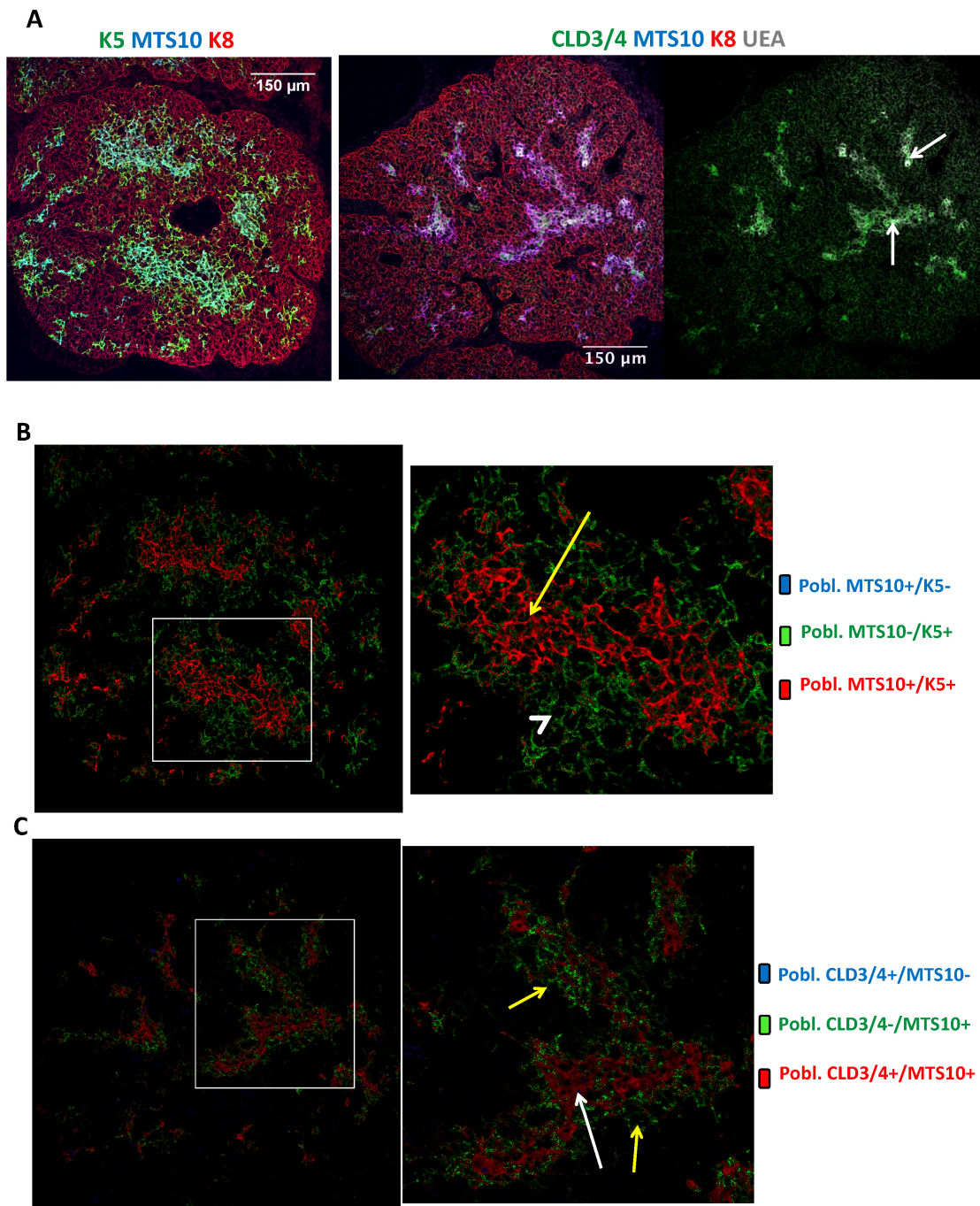


Figura 71. En timos wildtype de 15,5 dpc. MTS10 se expresa asociado a la población central Cld3/4+UEA+ y su periferia, todo ello englobado en la zona central de la región K5+. **A.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o de Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B y C.** Colocalización de las expresiones de MTS10 con K5 o Cld3/4, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) y de las poblaciones Cld3/4+/MTS10- (ausente, azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo) (**C**). Todo el epitelio es K8+. Las flechas blancas señalan la población central Cld3/4+UEA+K5+MTS10+ y las flechas amarillas la población circundante a ésta Cld3/4-K5+MTS10+, englobado todo ello dentro de la población K5+MTS10-Cld3/4- (cabezas de flecha).

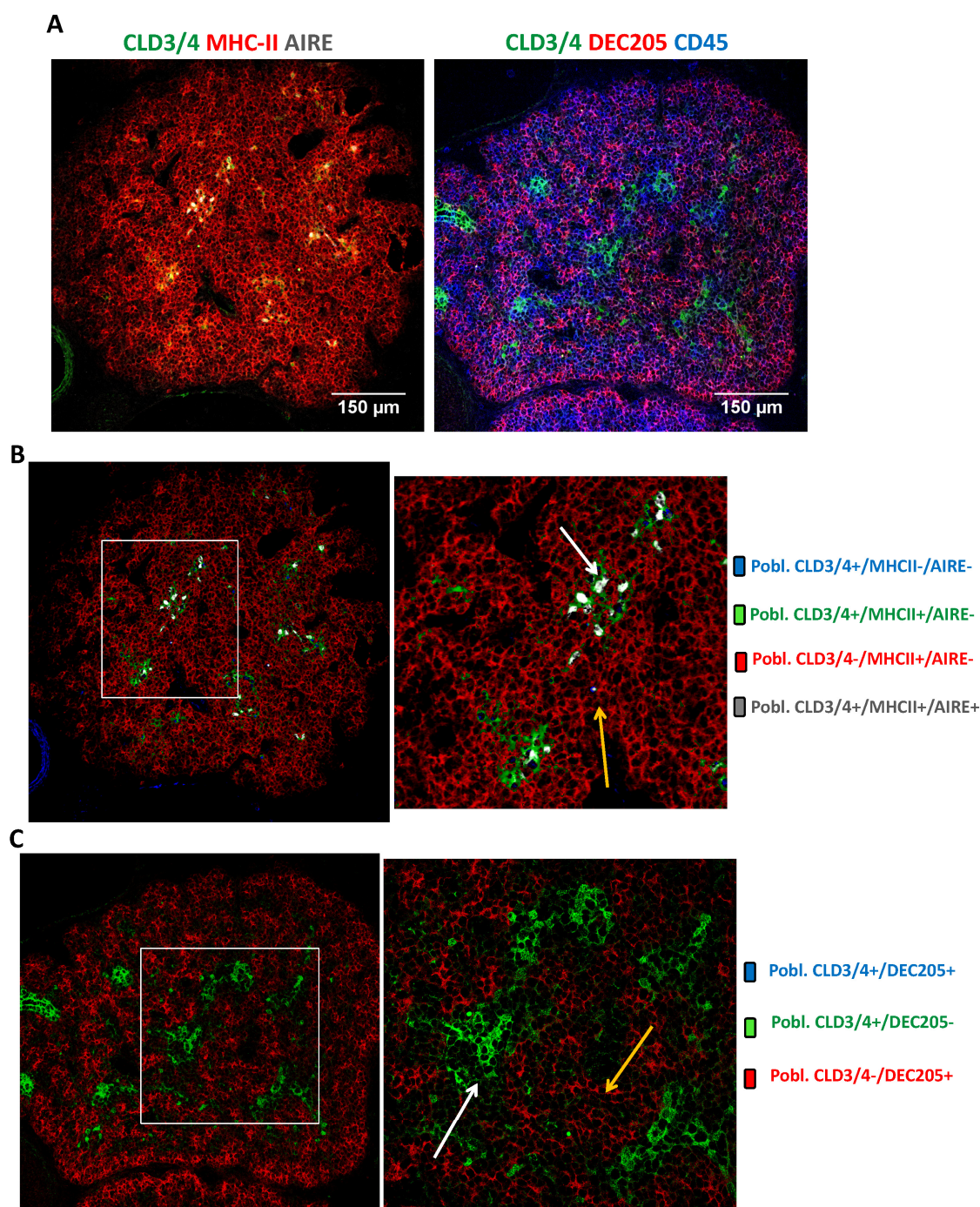


Figura 72. En timos wildtype de 15,5 dpc. la expresión de MHC-II se extiende por todo el epitelio, expresando AIRE algunas células apicales *Cld3/4+*MHCII+. DEC205 se expresa en toda la región *Cld3/4*-. Todas las criosecciones inmunomarcadas fueron analizadas con objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **A.** Inmunodetección de MHC-II (rojo), *Cld3/4* (verde) y AIRE (blanco) o de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y CD45 (azul). **B.** Colocalización de las expresiones de *Cld3/4*, MHC-II y AIRE donde se observa una superposición de las poblaciones *Cld3/4+*/MHCII-/AIRE- (azul), *Cld3/4+*/MHCII+/AIRE- (verde), *Cld3/4*-/MHCII+/AIRE- (rojo) y *Cld3/4*+/MHCII+/AIRE+ (blanco). Se observa en **A** que el timo ya contiene abundantes células CD45+. Se observa expresión de MHC-II por todo el epitelio (flecha amarilla), incluidas todas las células *Cld3/4*+ (flecha blanca) algunas de las cuales expresan AIRE. **C.** Colocalización de las expresiones de DEC205 y *Cld3/4*, donde se observan las poblaciones *Cld3/4*+/DEC205+ (ausente, azul), *Cld3/4*+/DEC205- (verde) y *Cld3/4*-/DEC205+ (rojo). DEC205 se expresa por todo el epitelio (flecha amarilla) salvo en las regiones *Cld3/4*+ (flecha blanca).

A 18,5 dpc. el timo era de mayor tamaño debido a la expansión del epitelio y su tridimensionalización consecuencia de la colonización linfoide, pero el patrón histológico definido por la expresión de K5, MTS10, Cld3/4 y UEA era, en esencia, el mismo que el descrito para el estadio anterior (fig. 73). A esta edad, a diferencia de estadios anteriores, las células circundantes a la región Cld3/4+ habían regulado negativamente la expresión de DEC205, que se expresaba por todo el epitelio salvo en las regiones Cld3/4+ y su periferia K5+MTS10+ (fig. 74 A). MHC-II se expresaba por todo el epitelio y algunas células medulares Cld3/4+ expresaban el regulador autoinmune AIRE (fig. 74 B) y, tanto estas células como las de la región circundante, expresaban CD80 (fig. 74 C). Estas células periféricas a las regiones Cld3/4+ que han regulado positivamente la expresión de CD80, expresaban hasta este estadio del desarrollo fetal DEC205, lo que indicaba que, al menos parte de las células que se comprometerán definitivamente a médula, habían expresado en algún momento de su desarrollo y diferenciación marcadores corticales.

En timos *wildtype* postnatales tempranos de 3 días, aparecían médulas continuas definidas por la expresión de MTS10, en cuya parte central se localizaban cordones celulares Cld3/4+UEA+, todo ello englobado dentro de la región K5+, que también se expresaba en células dispersas más basales y subcapsulares (fig. 75). Estas células apicales Cld3/4+ y parte de su periferia MTS10+K5+ expresaban, al igual que en el estadio anterior, los marcadores medulares CD80 y MHC-II estando, por tanto, la población CD80+ incluida en la MTS10+. El epitelio cortical DEC205+ también expresaba MHC-II pero con menor intensidad (fig. 76).

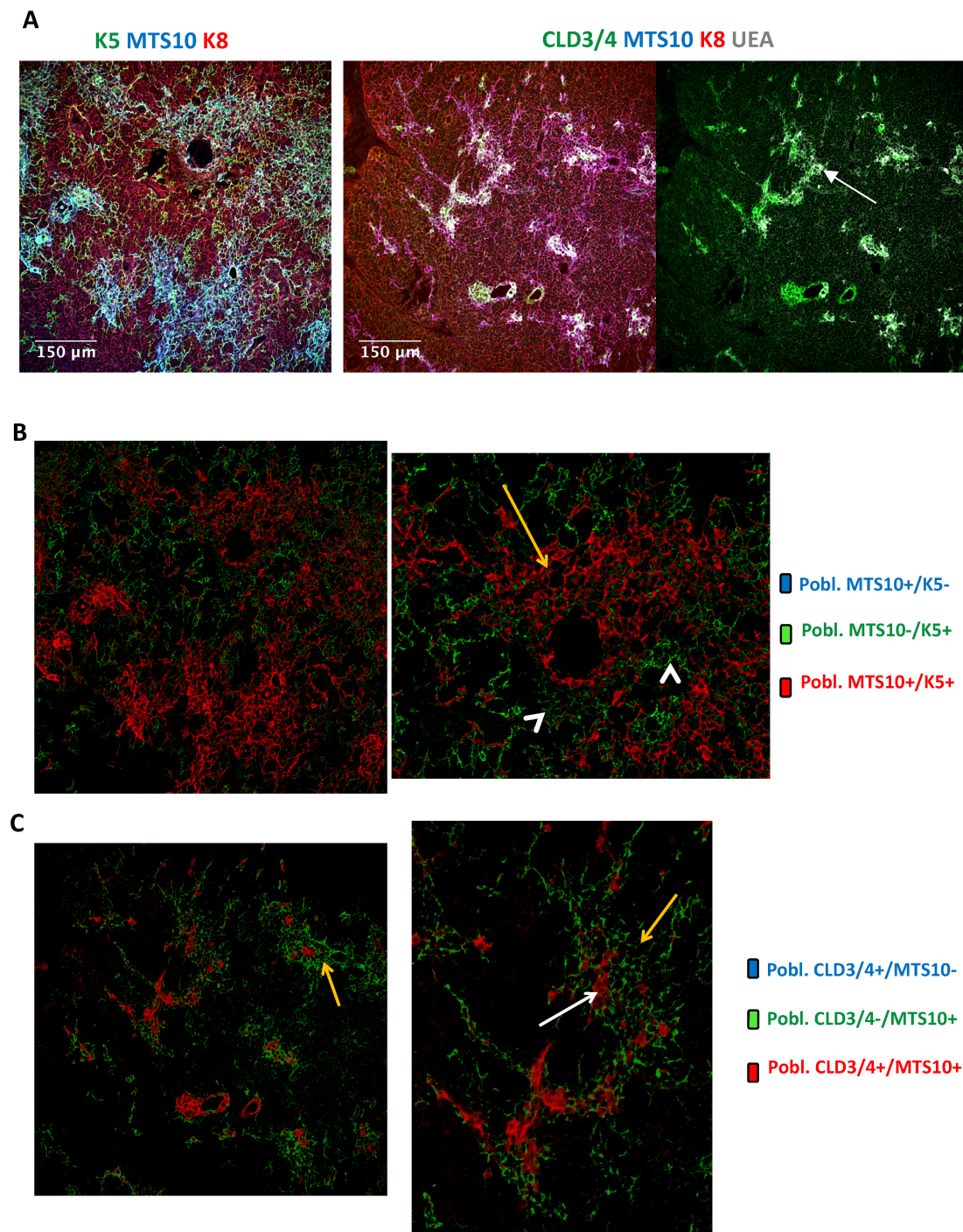


Figura 73. En timos *wildtype* de 18,5 dpc. *Cld3/4* y UEA se expresan en la zona central de la región *MTS10+*, incluido todo ello en las zonas más centrales de la región *K5+*, que se expresa también de forma dispersa en zonas más basales y subcapsulares. **A.** Criosecciones de 10 µm procesadas para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o *Cld3/4* (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM. **B y C.** Colocalización de la expresión de MTS10 con K5 o *Cld3/4*, donde se superponen las poblaciones *MTS10+/K5-* (ausente, azul), *MTS10-K5+* (verde) y *MTS10+/K5+* (rojo) (**B**) y de las poblaciones *Cld3/4+/MTS10-* (azul), *Cld3/4-/MTS10+* (verde) y *Cld3/4+/MTS10+* (rojo) (**C**). Todo el epitelio es *K8+*. Se observan cordones celulares *Cld3/4+UEA+K5+MTS10+/-* (flechas blancas) situados en la parte central de la población *Cld3/4-MTS10+K5+* (flechas amarillas), todo ello englobado dentro de la región *K5+MTS10-Cld3/4-* más amplia (cabezas de flechas), encontrándose células *K5+* dispersas en zonas basales y subcapsulares.

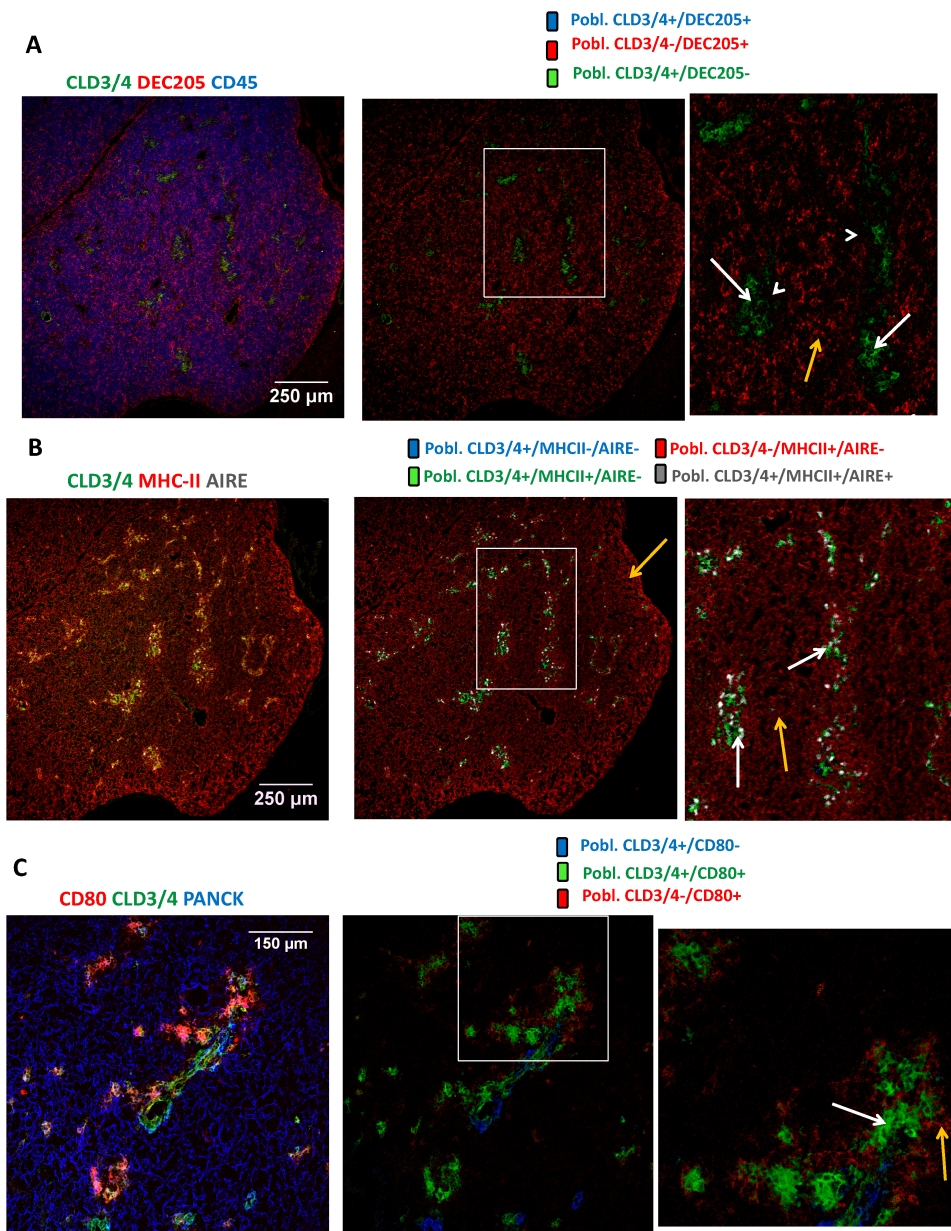


Figura 74. En timos wildtype de 18,5 dpc. DEC205 se expresa por todo el epitelio excepto en las regiones medulares *Cld3/4+* que expresan AIRE y CD80 y su periferia CD80+. MHC-II se expresa por todo el epitelio. Las criosecciones inmunomarcadas fueron analizadas con objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV (A, B) o HC PL APO lbd.BL 20.0x0.70 IMM (C). **A.** Inmunodetección de DEC205 (rojo), *Cld3/4* (verde) y CD45 (azul), y colocalización de las expresiones de DEC205 y *Cld3/4*, donde se observa la superposición de las poblaciones *Cld3/4+/DEC205+* (ausente, azul), *Cld3/4-/DEC205+* (rojo) y *Cld3/4+/DEC205-* (verde). DEC205 (flecha amarilla) se expresa en todo el epitelio salvo en las áreas *Cld3/4+* (flechas blancas) y su periferia (cabezas de flecha). **B.** Inmunodetección de MHC-II (rojo), *Cld3/4* (verde) y AIRE (blanco) y colocalización de sus expresiones, donde se muestran las poblaciones *Cld3/4+/MHCII-/AIRE-* (ausente, azul), *Cld3/4+/MHCII+/AIRE-* (verde), *Cld3/4-/MHCII+/AIRE-* (rojo) y *Cld3/4+/MHCII+/AIRE+* (blanco). MHC-II se expresa por todo el epitelio (flechas amarillas), incluidas las células *Cld3/4+* y el subset de las mismas que expresa AIRE (flechas blancas). **C.** Inmunodetección de CD80 (rojo), *Cld3/4* (verde) y pancitoqueratina (azul) y colocalización de las expresiones de *Cld3/4* y CD80, donde se muestra una superposición de las poblaciones *Cld3/4+/CD80-* (azul), *Cld3/4+/CD80+* (verde) y *Cld3/4-/CD80+* (rojo). Se observa una zona central *Cld3/4+CD80+* (flecha blanca), rodeada por células CD80+*Cld3/4-* (flecha amarilla), por lo que todas las células *Cld3/4+* son también CD80+.

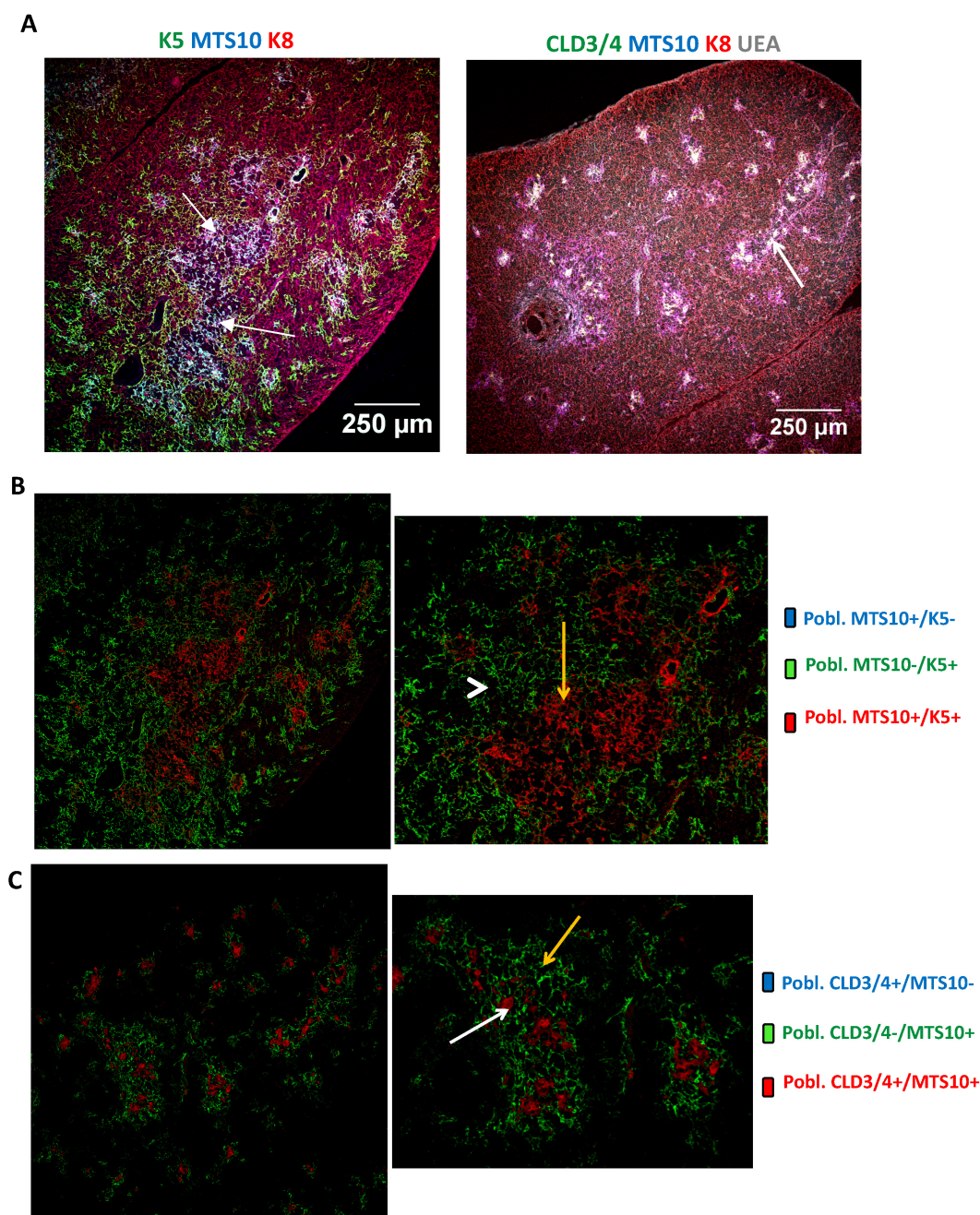


Figura 75. Los timos wildtype postnatales de 3 días presentan médulas continuas definidas por la expresión de MTS10, en cuya parte central se sitúan cordones celulares Cld3/4+UEA+, todo ello dentro de la región K5+. **A.** Criosecciones de 10 µm procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o de Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. Se observan médulas definidas por células Cld3/4+UEA+MTS10+K5+ (flechas). Todo el epitelio es K8+ y se observan células K5+ dispersas en zonas basales y subcapsulares. **B.** Colocalización de la expresión de MTS10 con K5, donde se muestra la superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo). Las flechas amarillas señalan médulas MTS10+/K5+ en la parte central del marcaje más amplio definido por células K5+MTS10- (cabezas de flecha). **C.** Colocalización de la expresión de MTS10 con Cld3/4, donde se muestra la superposición de las poblaciones Cld3/4+/MTS10- (azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo). Las flechas blancas señalan células apicales Cld3/4+MTS10+ situadas en la región central de la población medular Cld3/4-MTS10+ (flechas amarillas).

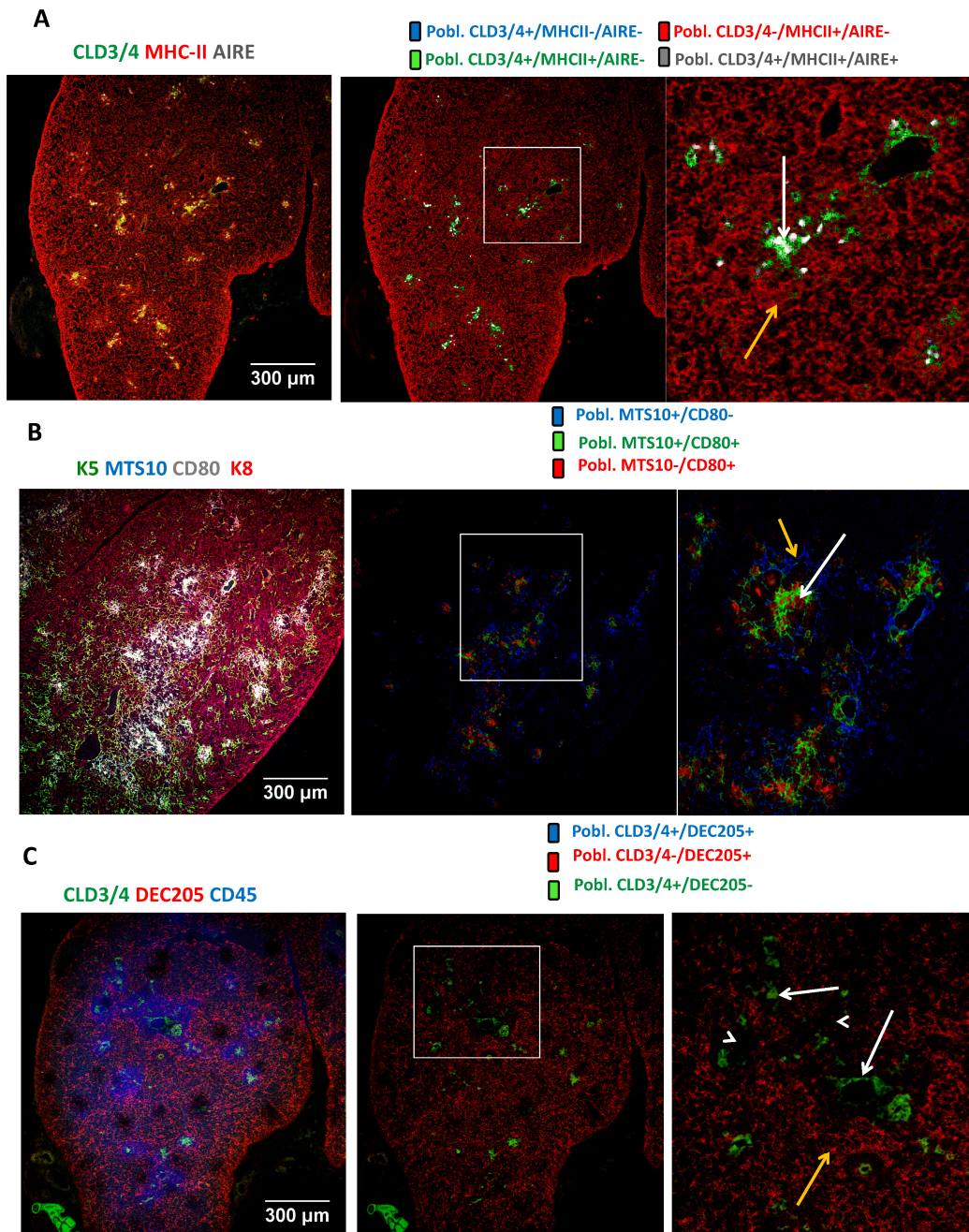


Figura 76. Corteza y médula en timos postnatales wildtype de 3 días: expresión de DEC205, MHC-II, CD80 y AIRE. Todas las imágenes fueron obtenidas con objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. **A.** Inmunodetección de MHC-II (rojo), Cld3/4 (verde) y AIRE (blanco) y colocalización de las expresiones donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII-/AIRE- (ausente, azul), Cld3/4+/MHCII+/AIRE- (verde), Cld3/4-/MHCII+/AIRE- (rojo) y Cld3/4+/MHCII+/AIRE+ (blanco). MHC-II se expresa por todo el epitelio (flecha amarilla), incluyendo a las células Cld3/4+ y al subset de las mismas que expresan AIRE (flecha blanca). **B.** Inmunodetección de MTS10 (azul), K8 (rojo) y CD80 (blanco) y colocalización donde se observan las poblaciones MTS10+/CD80- (azul), MTS10+/CD80+ (verde) y MTS10-/CD80+ (rojo). Notar la expresión del marcador medular CD80 (flecha blanca) en la parte central de las médulas definidas por MTS10 (flecha amarilla). **C.** Inmunodetección de DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y CD45 (azul) y colocalización de la expresión de DEC205 y Cld3/4, donde se observan las poblaciones Cld3/4+/DEC205+ (ausente, azul), Cld3/4-/DEC205+ (rojo) y Cld3/4+/DEC205- (verde). Se observa expresión de DEC205 por todo el epitelio (flecha amarilla) excepto en las zonas medulares Cld3/4+ (flechas blancas) y su periferia (cabezas de flecha).

El timo *wildtype* de 7 días postnatal mostraba una corteza y una médula claramente definidos, aunque todo el epitelio continuaba siendo K8+ a esta edad (fig. 77), siendo muy similar esta estructura a la descrita para timos alinfoides adultos tras su colonización linfoide (ver figs. 64-65). La médula, por tanto, quedaba finalmente determinada por una expresión continua de carácter ramificado de MTS10 y MHC-II, en cuya parte central se situaban cordones celulares Cld3/4+UEA+, expresando algunas de estas células el regulador autoinmune AIRE, y éstas y parte de su periferia MTS10+ el marcador medular CD80, todo ello englobado dentro de la región K5+. La corteza, a su vez, queda determinada, al igual que ya sucedía en estadíos anteriores y en timos *Ikaros* $-/-$ de 1 mes de edad, por la expresión de DEC205 existiendo células dispersas K5+ y algunas MTS10+ en la corteza, observándose también expresión de MHC-II aunque con menor intensidad que en la médula (fig. 77-78).

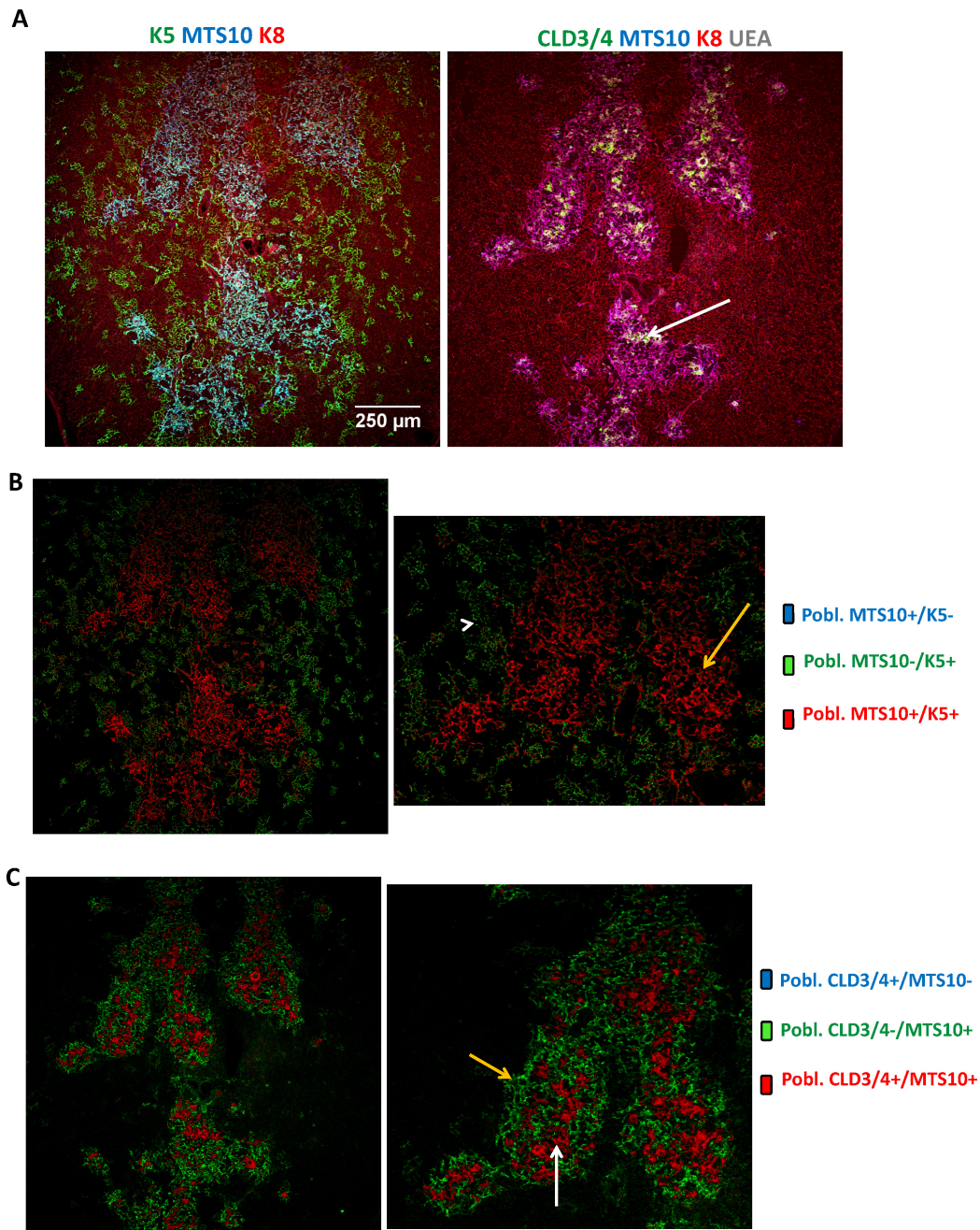


Figura 77. Compartimentalización corteza/médula en timos wildtype postnatales de 7 días, cuyo epitelio expresa K8. La médula constituye una región continua MTS10+ dentro de la cual se sitúan los cordones celulares Cld3/4+UEA+, todo ello englobado en la región K5+. A. Criosecciones de 10 µm procesados para inmunodetección de K5 (verde), MTS10 (azul) y K8 (rojo) o Cld3/4 (verde), MTS10 (azul), K8 (rojo) y UEA (blanco). Objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. **B y C.** Colocalización de la expresión de MTS10 con K5 o Cld3/4, donde se muestra una superposición de las poblaciones MTS10+/K5- (ausente, azul), MTS10-/K5+ (verde) y MTS10+/K5+ (rojo) (**B**) y de las poblaciones Cld3/4+/MTS10- (azul), Cld3/4-/MTS10+ (verde) y Cld3/4+/MTS10+ (rojo) (**C**). La médula está definida por una población central Cld3/4+UEA+MTS10+K5+ (flechas blancas) situada en la región central de la población Cld3/4-MTS10+K5+ (flechas amarillas), todo ello incluido en la población más amplia K5+MTS10-Cld3/4- (cabezas de flecha). El resto del epitelio constituye la corteza tímica.

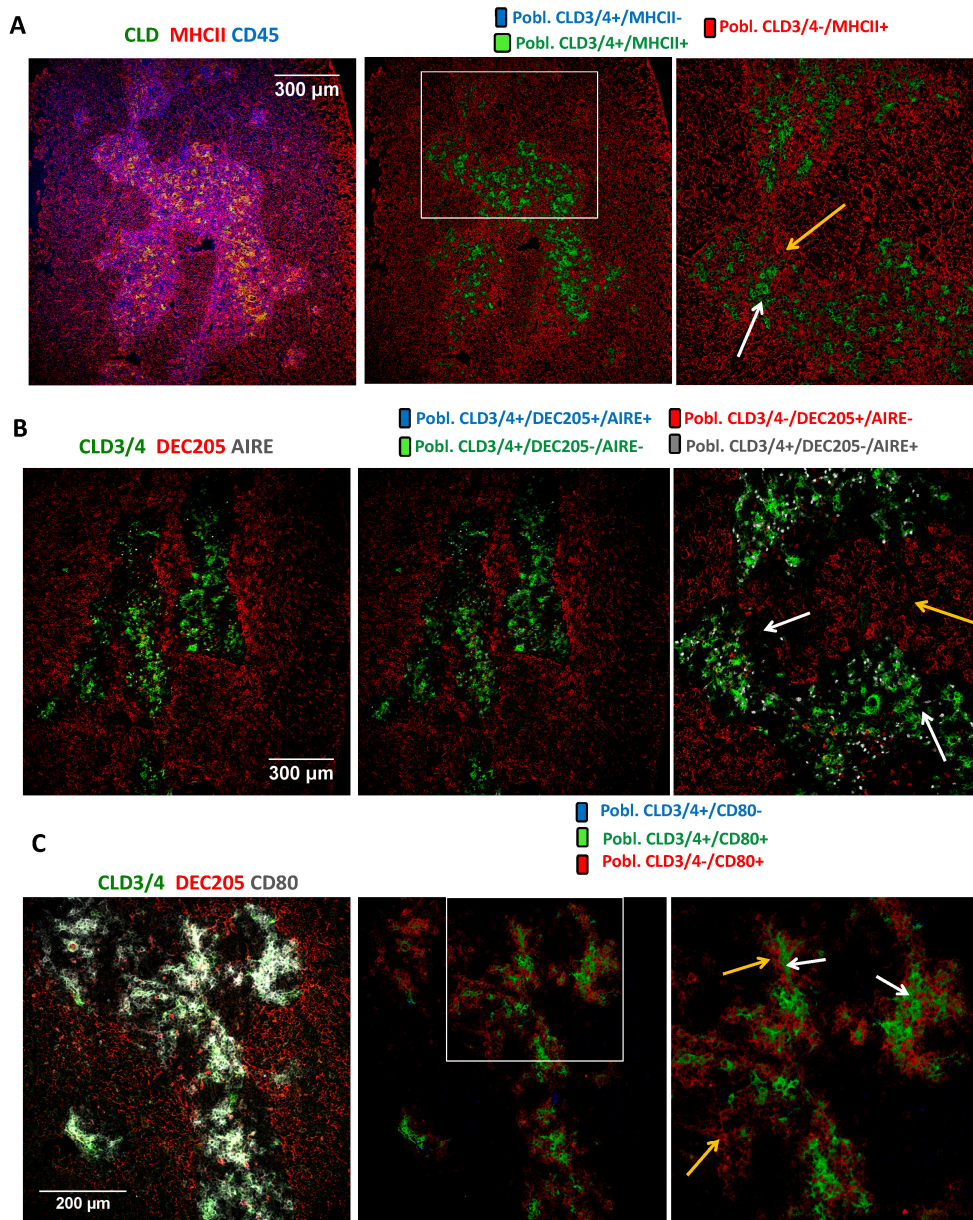


Figura 78. Corteza y médula en timos wildtype postnatales de 7 días. La expresión de DEC205 define la corteza externa a la región medular DEC205- definida por las células Cld3/4+ que expresan AIRE y CD80 y su periferia CD80+. La expresión de MHC-II es mas intensa en las regiones medulares. Todas las criosecciones inmunomarcadas fueron analizadas con objetivo HC PL APO CS 10.0x0.40 UV. A. Inmunodetección de MHC-II (rojo), Cld3/4 (verde) y CD45 (azul) y colocalización de las expresiones donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/MHCII- (ausente, azul), Cld3/4+/MHCII+ (verde) y Cld3/4-/MHCII+ (rojo). MHC-II se expresa por todo el epitelio pero con más intensidad en las zonas medulares (flecha amarilla), incluyendo la población Cld3/4+ (flecha blanca). **B.** Inmunodetección de DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y AIRE (blanco) y colocalización de las expresiones donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/DEC205+/AIRE+ (ausente, azul), Cld3/4+/DEC205-/AIRE- (verde), Cld3/4-/DEC205+/AIRE- (rojo) y Cld3/4+/DEC205-/AIRE+ (blanco). DEC205 se expresa en la corteza (flecha amarilla) fuera de la región Cld3/4+, que puntualmente expresa AIRE, y su periferia (flechas blancas). **C.** Criosecciones de 10 μ m procesadas para inmunodetección de DEC205 (rojo), Cld3/4 (verde) y CD80 (blanco) y colocalización de las expresiones donde se muestran las poblaciones Cld3/4+/CD80- (ausente, azul), Cld3/4+/CD80+ (verde) y Cld3/4-/CD80+ (rojo). CD80 se expresa en las células medulares Cld3/4+ (flechas blancas) y su periferia (flechas amarillas).

En resumen, dado que en el estadio adulto de timos *wildtype* observamos finalmente una compartimentalización corteza/médula con una expresión de marcadores funcionales específicos de cTECs y mTECs, respectivamente, similar a la observada en timos alinfoides colonizados postnatalmente, la base de estos procesos, además de ser dependientes de la presencia de células linfoides en el timo, debe residir en las características de los timos alinfoides y puede ser recuperada, al menos parcialmente, con su colonización postnatal. En el caso del timo *wildtype* observábamos un mayor grado de diferenciación luminal, regulación positiva de Cld3/4 y ramificación del esbozo inicial del lumen que el observado en timos alinfoides *NSG* e *Ikaros* $-/-$, sobre todo en los primeros estadios, pero seguía sin tener lugar una diferenciación total y una reorganización como lumen, ni la desestratificación observados en los timos *Nude*, traducándose, por tanto, estos procesos en una mayor continuidad de la médula que en los timos alinfoides. Por tanto, de alguna manera la presencia de linfocitos revierte, en parte, el efecto inhibitorio que tenía FoxN1, como observábamos en los timos alinfoides, sobre el proceso de tubulogénesis y organogénesis ramificada observado en los timos *Nude* (fig. 79).

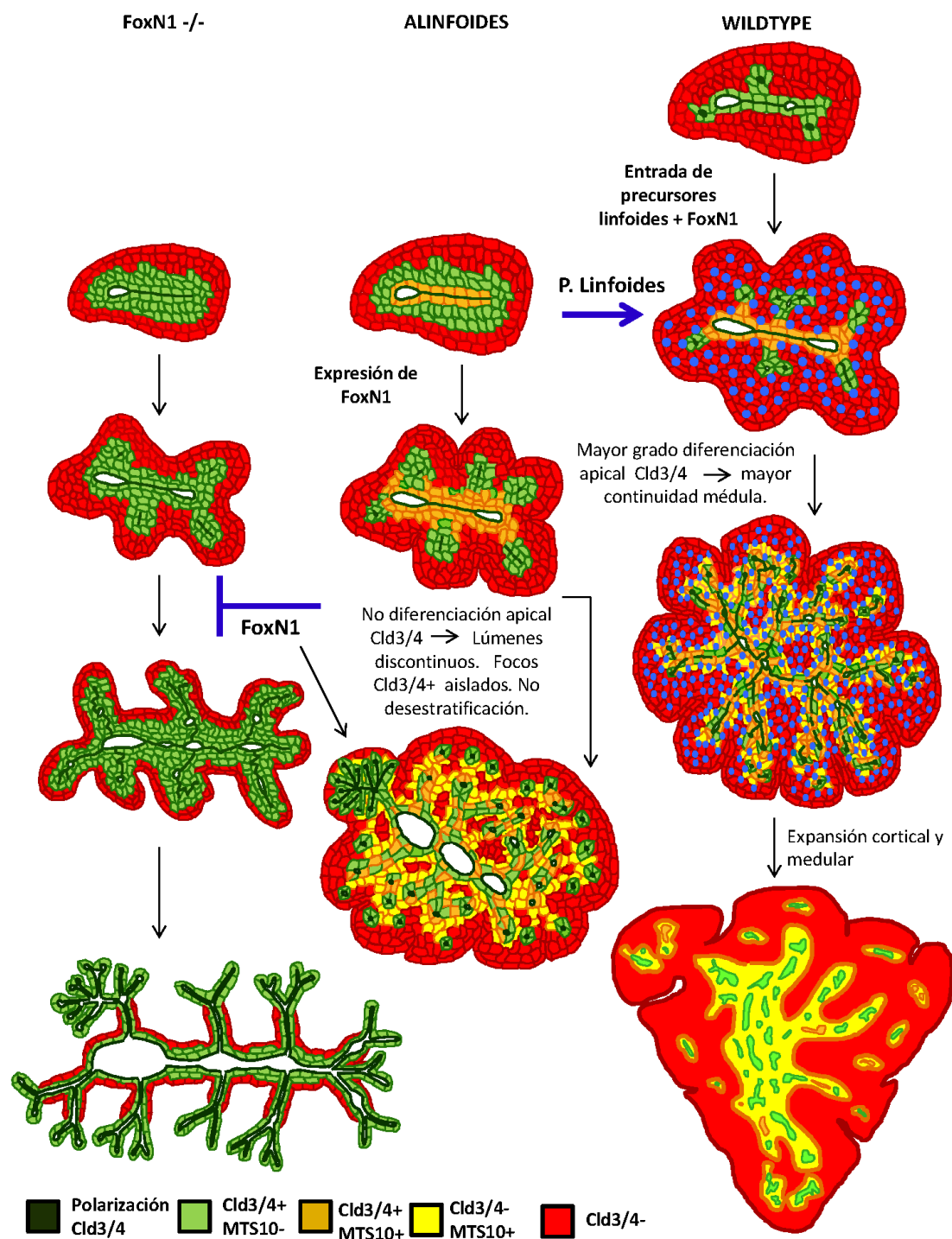


Figura 79. Esquema resumen del efecto de la expresión de FoxN1 y la presencia de precursores linfoides sobre el desarrollo del epitelio tímico. En ausencia de FoxN1 el epitelio se desarrolla según un proceso de tubulogénesis por el que las células de la masa intermedia diferencian a células apicales regulando positivamente la expresión de Cld3/4 e incorporándose a la formación de lumen, a la vez que la estructura epitelial mediante diferenciación apical desestratifica y se ramifica. En presencia de FoxN1 y ausencia de timocitos (timos alinfoides), las células de la masa intermedia inicialmente diferencian a células apicales regulando positivamente la expresión de Cld3/4 y de otros marcadores apicales como MTS10, pero a partir de un momento del desarrollo la expresión de FoxN1 inhibe parcialmente este proceso de diferenciación apical, permitiendo la upregulación de MTS10 pero no de Cld3/4, lo que

resulta en focos luminales *Cld3/4+* discontinuos y en una estructura más engrosada. En presencia de precursores linfoides (timos wildtype) tanto el grado de diferenciación a células apicales mediante la regulación positiva de *Cld3/4* como el de ramificación es mayor que en los timos alinloides, pero no se produce ni una diferenciación luminal total ni la desestratificación que acontece en el timo *Nude*, traducándose estos procesos en una mayor continuidad de la médula que se mantiene en estadios postnatales.

5. Los lóbulos tímicos tempranos se comportan *in vitro* de acuerdo a un modelo de organogénesis ramificada.

Como se ha indicado, los resultados del presente trabajo indicaban que el timo *wt* se desarrollaba según un modelo de organogénesis ramificada similar al de otros órganos epiteliales (glándula salivar, glándula mamaria, páncreas), modificado por la expresión de *FoxN1* y la presencia de precursores linfoides. Según este modelo, el compromiso corteza/médula se determinaba topológicamente en relación al lumen central primitivo resultante de la evaginación del endodermo faríngeo, de forma que la médula surgía en última instancia a partir de las células centrales que diferenciaban inicialmente a lumen, mientras que las células que se comprometerán con la estirpe cortical estarían alejadas de tal lumen, expandiéndose hacia fuera del órgano. Esta inhibición parcial del proceso de tubulogénesis, aunque necesaria, también parece importante que no sea total, dado que en ella se fundamenta la diferenciación corteza y médula y también parece estar influida por la presencia de las células linfoides. Para confirmar estos aspectos analizamos si el cultivo de fragmentos tímicos “replicaba” *in vitro* esta capacidad de crecimiento ramificado y formación de lumen de los timos *wt*.

5.1. Lóbulos tímicos tempranos mantenidos en cultivos bi y tridimensionales generan estructuras donde la polarización de los marcadores concuerda con la descrita *in situ* durante la organogénesis ramificada.

Los lóbulos tímicos fetales no mantenían su estructura en cultivos orgánicos. En otros tejidos que sufren morfogénesis ramificada, como la glándula mamaria, estas estructuras tridimensionales pueden inducirse en cultivos embebidos en matriz o tan sólo con una dilución de la misma añadida en suspensión (Plachot y cols., 2009). En

base a estos resultados, evaluamos la capacidad *in vitro* de las TECs de lóbulos tímicos *wildtype* de 12,5 dpc. en presencia de una matriz extracelular para reproducir estructuras similares a las formadas por células epiteliales de otros órganos ramificados, como son la polaridad ápico-basal y la capacidad de generar estructuras 3D, en cultivos tanto bi como tridimensionales.

En primer lugar, analizamos cultivos bidimensionales a partir de explantes de lóbulos completos de 12,5 dpc. que, tras la eliminación de la cápsula externa de mesénquima, pusimos en cultivo sobre una matriz extracelular. Tras 8-9 días, tiempo en el que los explantes se adherían a la matriz y empezaban a expandirse, se formaban colonias en forma de monocapa en las que las células polarizaban la expresión de las queratinas, de forma que la K5 se disponía más apicalmente mientras que la K8 lo hacía más homogénea o basalmente (fig. 80 A, B).

En cultivos tridimensionales, fragmentos tímicos fetales de 12,5 dpc. tras 2-3 días en cultivo, formaban colonias en forma de esfera hueca, con un lumen central, que variaban desde monoestratificadas a pluriestratificadas. En todas ellas se observaba que las TECs polarizaban la expresión de queratinas, de forma que en las colonias monoestratificadas la K5 estaba polarizada hacia la membrana luminal (fig. 81 A, C) y en las colonias formadas por más capas celulares las células K5+ delimitaban el lumen (polaridad apical), mientras que las K8+ se situaban en una posición basal (fig. 81 B, C). En las colonias más desarrolladas, formadas por un mayor número de células, el lumen central estaba claramente ramificado (fig. 82).

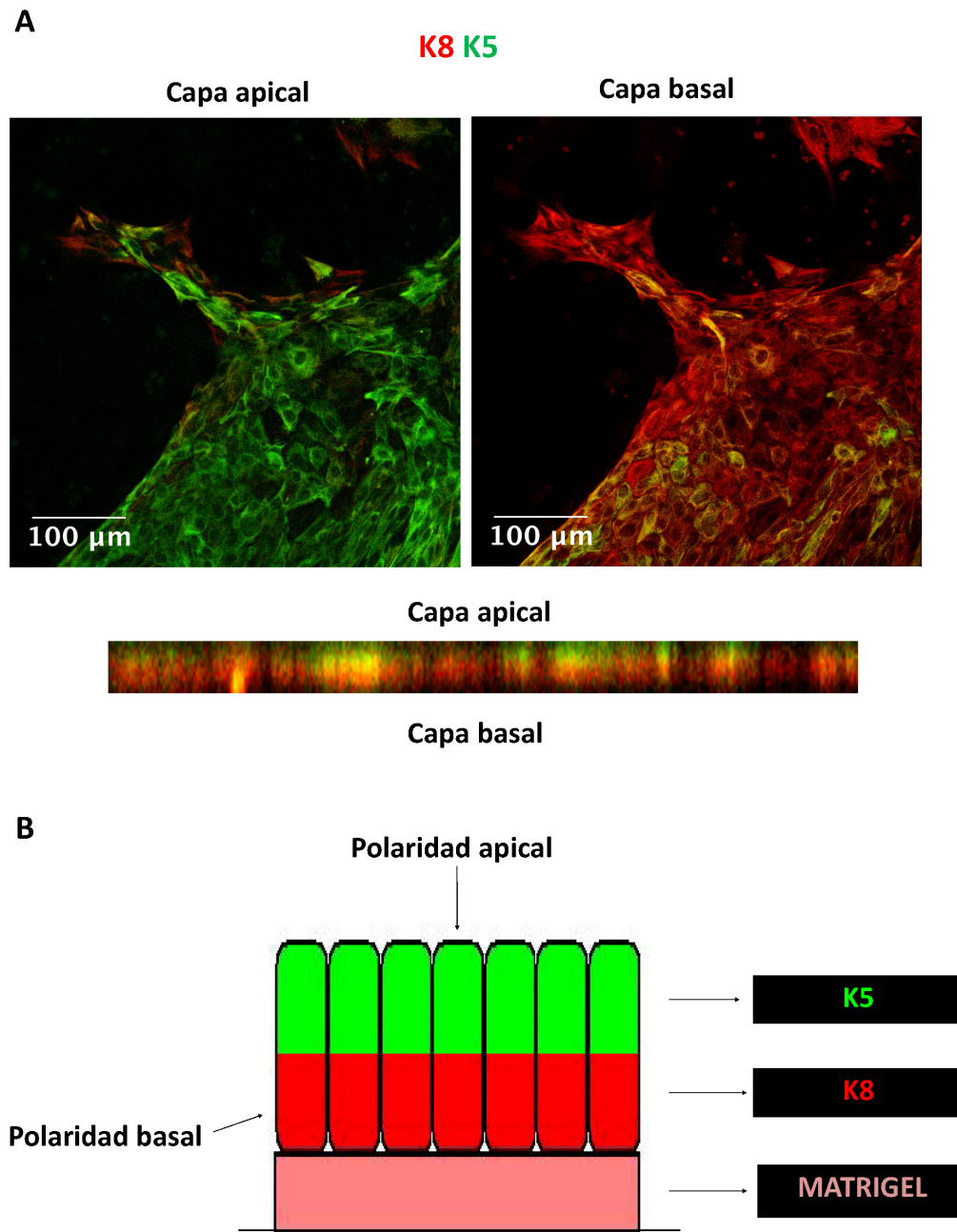


Figura 80. Las TECs polarizan la expresión de queratinas. **A.** Secciones de una misma colonia en dos planos distintos del eje z observadas con objetivo 20.0x0.40 CORR PH1, tras ser procesadas por inmunohistoquímica para K5 (verde) y K8 (rojo). Se observa mayor expresión de K5 en el plano apical que en el basal, donde la expresión de K8 es mucho mayor. La barra muestra una vista lateral en el eje y de un conjunto de planos en z de la colonia, donde se observa que la expresión de K5 (verde) se localiza apicalmente. **B.** Esquema donde se muestra la forma de polarización de las TECs en cultivos 2D sobre matrigel: polarizan la expresión de K5 (verde) hacia la zona apical y la de K8 (rojo) hacia la basal.

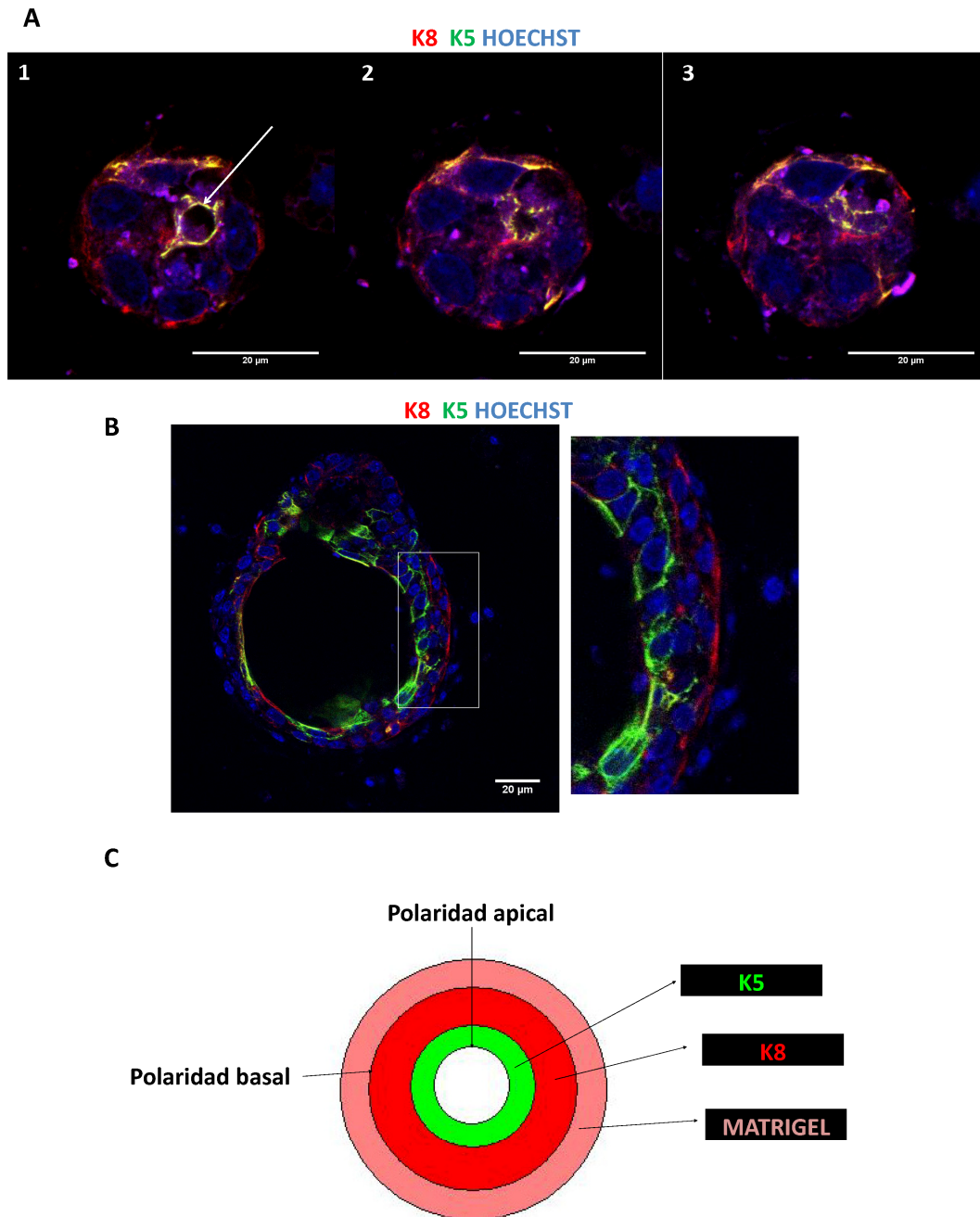


Figura 81. Los fragmentos de lóbulos tímicos de 12,5 dpc. crecidos tridimensionalmente *in vitro* forman colonias con un lumen central en las que las células segregan en dominios con polaridad **apical-basal**. Secciones obtenidas de distintas colonias tras 2-3 días en cultivo rodeadas por una matriz, procesadas por inmunohistoquímica para K5 (verde), K8 (rojo) y Hoechst (azul) y escaneadas en xyz con objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. **A.** Distintas secciones de una misma colonia monoestratificada donde las células polarizan la expresión de K5 hacia el lumen (flecha). **B.** Colonia formada por más capas celulares donde alrededor de un lumen central se sitúan las células K5+ (detalle enmarcado). **C.** Esquema de organización ápico-basal de las TECs al crecer en 3D rodeadas por una matriz donde las células K5+ (verde) se sitúan asociadas al lumen (posición apical) y las K8+ (rojo) lo hacen en posición basal.

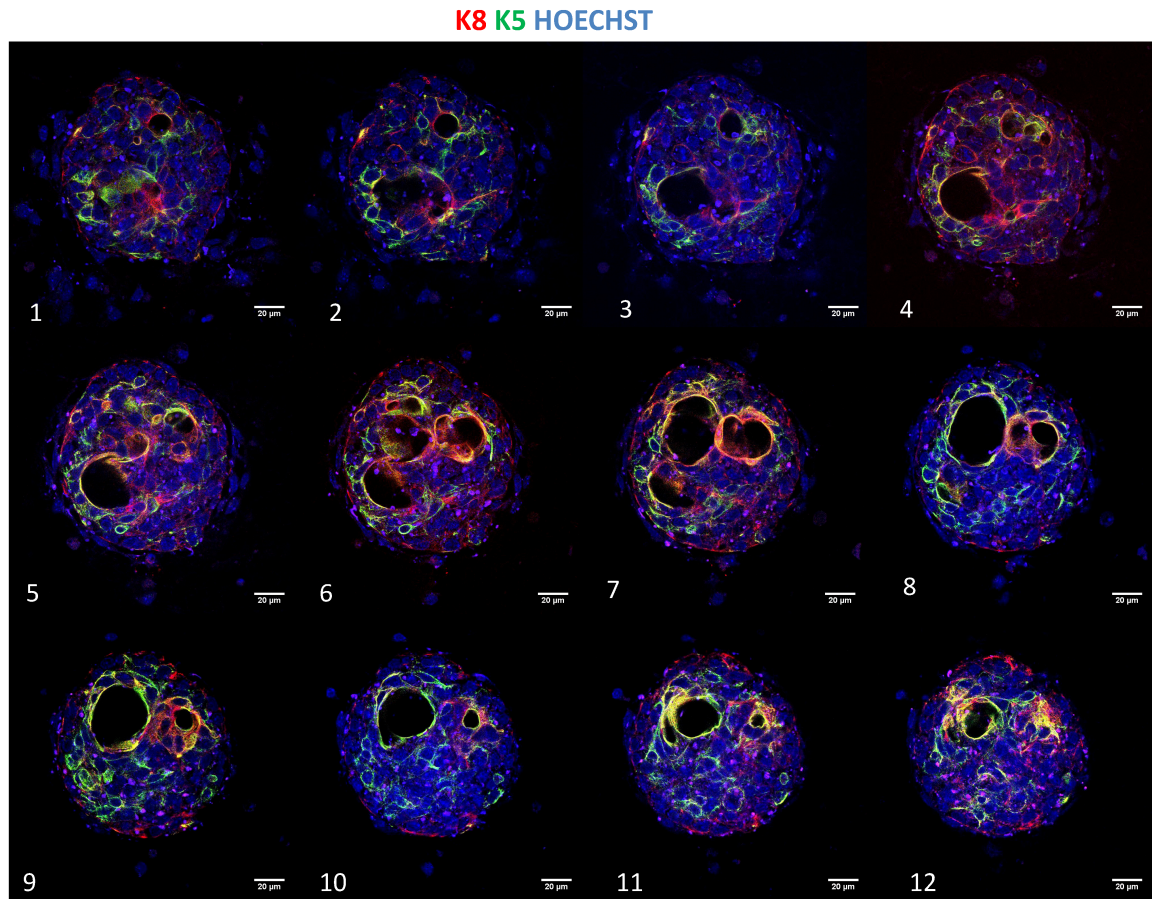


Figura 82. Las colonias más desarrolladas de fragmentos de lóbulos tímicos de 12,5 dpc. crecen en cultivos tridimensionales dejando un lumen central ramificado. Las colonias fueron procesadas para inmunodetección de K5 (verde), K8 (rojo) y Hoechst (azul). Secciones escaneadas en xyz con objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV con una separación de 1µm entre ellas. Los números indican el orden de las secciones. La colonia ha crecido dejando un lumen central que ramifica varias veces, donde las células K5+ se sitúan alrededor del mismo.

Todos estos resultados *in vitro* confirmaban, por tanto, que los lóbulos tímicos de 12,5 dpc., contenían, al menos, dos poblaciones que tendían a segregarse en dominios con distinta disposición ápico-basal y que, en presencia de una matriz extracelular, se organizaban formando un lumen en ocasiones ramificado, similar al observado en el timo *Nude*.

5.2. La expresión de FoxN1 inhibe la respuesta de los lóbulos tímicos en cultivo orgánico al aporte exógeno de factores de crecimiento recuperándose en presencia de precursores linfoides.

La adición exógena al medio de cultivo de determinados factores de crecimiento, como FGF7, FGF10 y EGF, todos ellos implicados en el desarrollo y morfogénesis del timo (*Shinohara y Honjo, 1996; Revest y cols., 2001; Dooley y cols., 2007*), en cultivos orgánicos de órganos ramificados como la glándula salivar (*Nogawa y Takahashi, 1991; Steinberg y cols., 2005; Haara y cols., 2009*), permite en presencia de una matriz la formación de estructuras ramificadas tal y como ocurre en el órgano *in situ*. Como hemos demostrado, la presencia de FoxN1 inhibe la tubulogénesis de manera que la estructura no se mantiene en cultivo orgánico, hecho revertido en parte por la presencia de linfocitos. Por ello, evaluamos si la respuesta a la adición exógena de FGF7, FGF10 y EGF que, como hemos comentado, ejerce distintos efectos sobre la morfogénesis ramificada de otros órganos ramificados, se veía modificada por la presencia y/o ausencia de FoxN1 y precursores linfoides, de forma compatible con lo descrito para el desarrollo del timo *in vivo*. Para ello analizamos los efectos de la adición de dichos factores en FTOCs de lóbulos tímicos de 15,5 dpc. de ratones *Nude*, *NSG* y *wildtype* en presencia del mesénquima circundante.

Tras 7 días en cultivo orgánico, observamos que los lóbulos tímicos *Nude* y *wildtype* respondían de distinta forma a FGF7 y FGF10, mientras que los lóbulos tímicos *NSG* no parecían responder a dichos factores ya que mantenían los mismos quistes o lúmenes en las mismas posiciones y un tamaño similar comparado con su control que no recibía los factores. La adición de FGF7 provocaba en el timo *Nude* un aumento del tamaño del lóbulo con respecto al control, así como la formación de grandes lúmenes y quistes. En el caso de los lóbulos *wildtype*, parecía tener un efecto similar induciendo la formación de quistes, lúmenes y la disposición radial y ramificada del epitelio. En este caso no se observaba un aumento del tamaño sino, por el contrario, una disminución ya que estos lóbulos tenían menor presencia de linfocitos que el control sin tratamiento. Por su parte, la adición de FGF10 daba lugar a una

estructura más maciza con presencia de estructuras similares a yemas en la periferia en timos *Nude*, así como un ligero aumento del tamaño del lóbulo con respecto al control, efecto que también parecía suceder en el timo *wt*, en cuyo caso el crecimiento del lóbulo era aún más acusado (fig. 83). En el caso de los lóbulos tratados con EGF, este inducía en todos los casos una disminución del tamaño de los lóbulos con respecto al control observando, además en el caso de timos alinfoides (*NSG*) y *Nude*, que el epitelio adquiría un aspecto replegado (fig. 83).

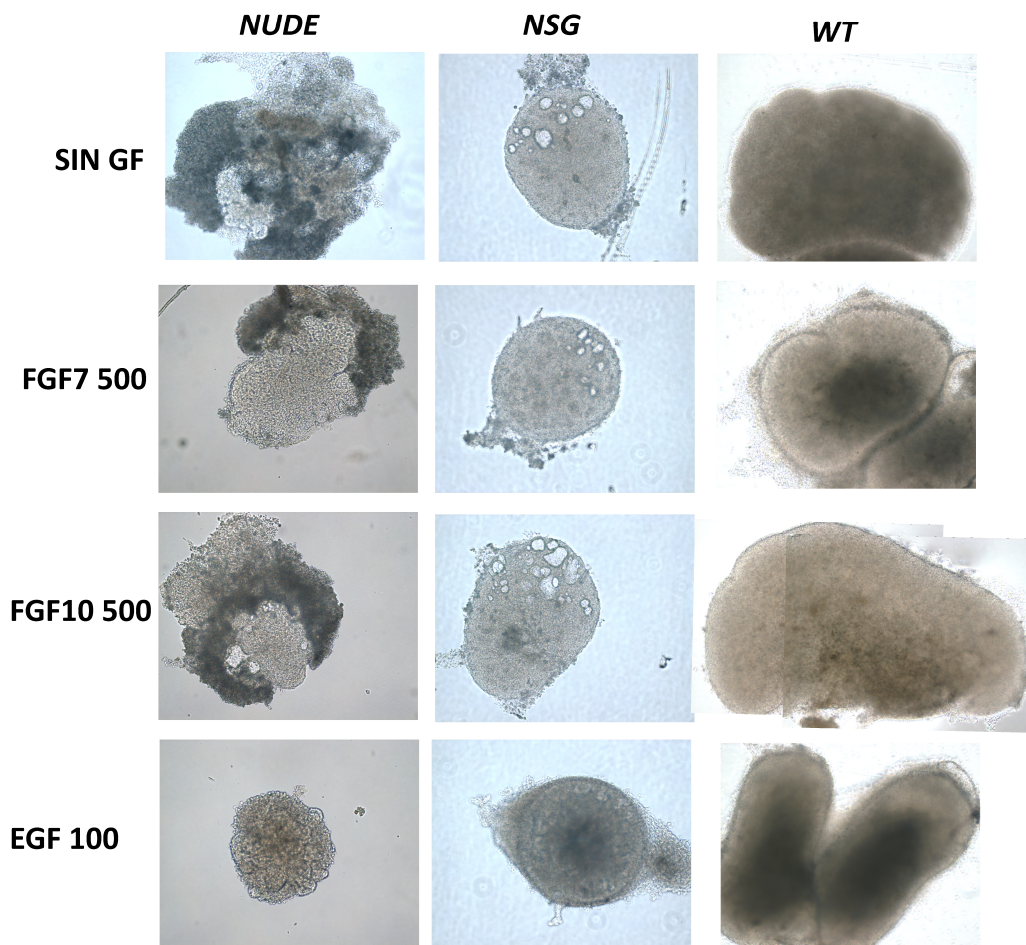


Figura 83 A

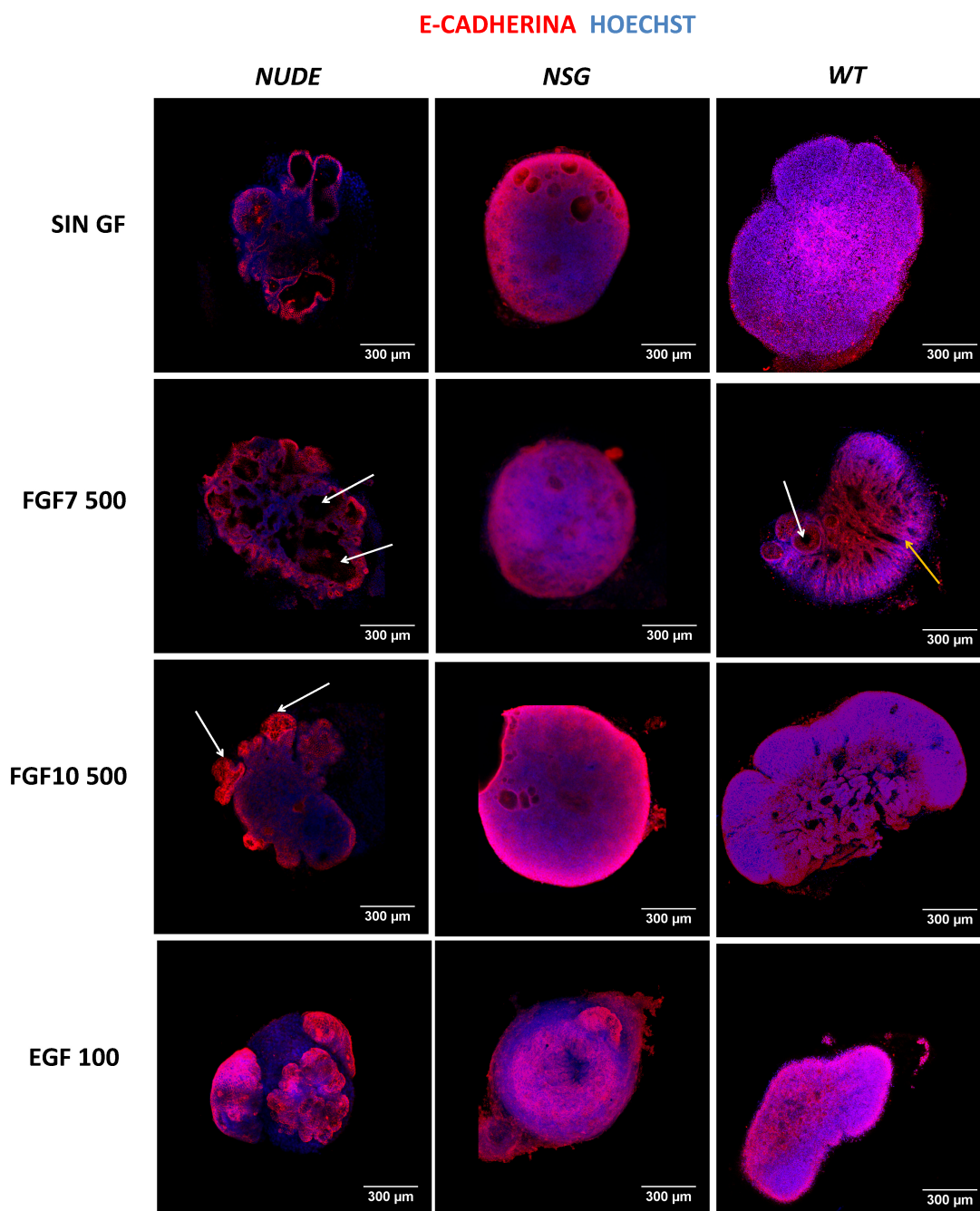


Figura 83 B

Figura 83. La respuesta de los lóbulos tímicos en cultivo orgánico (FTOC) a factores de crecimiento (GF) es inhibida en presencia de FoxN1 y recuperada en presencia de células linfoides. A. Imágenes obtenidas en campo claro con un microscopio óptico con objetivo de 10X de lóbulos tímicos de 15,5 dpc. de ratones Nude, NSG y wildtype, tras 7 días en cultivo orgánico (FTOC) con distintos factores de crecimiento. **B.** Panel donde se muestran proyecciones de máxima intensidad de algunos planos de lóbulos tímicos de 15,5 dpc. de ratones Nude, NSG y wildtype, tras 7 días en cultivo orgánico (FTOC) con distintos factores de crecimiento. Los FTOCs fueron procesados para inmunodetección “in toto” de E-cadherina (rojo) y Hoechst (azul). Objetivo 20.0x0.40 CORR PH1 (NSG) o HC PL APO CS 10.0x0.40 UV (Nude y wildtype). Los números indican la concentración en ng/ml utilizada de cada factor. Se observa que FGF7 induce en los timos Nude y wt la formación de lúmenes (flechas blancas), además de una

disposición radial y ramificada del epitelio en timos wt (flecha amarilla). Por su parte, FGF10 induce en timos Nude y wt la formación de una estructura epitelial más maciza y un aumento del tamaño del lóbulo, mucho más acusado en timos wt, con presencia de estructuras similares a yemas en la periferia de timos Nude (flechas). Los timos NSG no muestran repuesta a la adición de FGF7 o FGF10. EGF induce una disminución del tamaño del lóbulo en todos los casos, así como un aspecto replegado del epitelio en timos Nude y NSG.

Estos resultados indicaban que, como se ha descrito para otros órganos, EGF, FGF7 y FGF10 influyen en el crecimiento ramificado y en la formación de lumen en el timo *Nude*. Sin embargo, este efecto se ve modificado también en presencia de FoxN1 y de células linfoides. De esta forma, la presencia de FoxN1 en ausencia de precursores linfoides, que como hemos explicado anteriormente inhibía la tubulogénesis en timos alinfoides *in situ*, parece inhibir también la capacidad de respuesta del epitelio a FGF7 y FGF10, mientras que la presencia de células linfoides restauraba o revertía, al menos parcialmente, esta inhibición, favoreciendo el hecho de que estos factores contribuyan *in vitro* al crecimiento de los lóbulos tímicos cultivados con características de crecimiento ramificado y formación de lumen, que no ocurren en los lóbulos sin tratamiento.

Discusión

Como se indicaba en la *Introducción* de este trabajo, recientemente propusimos que la organogénesis tímica se basaba o contenía aspectos típicos de un patrón de desarrollo de morfogénesis ramificada similar al seguido por otros órganos epiteliales que sufren ramificación durante el desarrollo (*Muñoz y cols., 2014*). Según este patrón la médula tímica surge a partir de células formadoras de lumen, que expresan K5 y Cld3/4 desde estadios muy tempranos, y que forman una estructura ramificada que aumenta su longitud y grado de ramificación a medida que avanza el desarrollo. Sin embargo, la presencia de precursores linfoides inducen en el timo una estructura especial con características diferentes a las de cualquier otro órgano epitelial ramificado, ya que producen la tridimensionalización del epitelio modificando las polaridades celulares, dificultando, por tanto, la identificación de la estructura histológica tímica. Por otra parte, en estadios de desarrollo posteriores, el timo no presenta un lumen aparente, aunque se mantiene una estructura ramificada de la médula.

Algunos datos previos apuntaban a que este patrón de desarrollo basado en una morfogénesis ramificada y de formación de lumen existía en ratones *Nude*, por lo que podría especularse que constituía la base de partida sobre la cual, la presencia de FoxN1 y células linfoides, ambos ausentes en ratones *Nude* y considerados imprescindibles para el desarrollo tímico (*Nehls y cols., 1996; Balciunaite y cols., 2002; Romano y cols., 2013*), modelarían el desarrollo del timo normal. De esta manera, el programa específico de diferenciación a timo, determinado básicamente por la expresión de FoxN1 y la presencia de linfocitos, se superpondría a este patrón básico de morfogénesis ramificada, modificándolo.

En el presente estudio hemos utilizado una aproximación experimental “de ganancia de funciones”, analizando primero el desarrollo del timo de ratones *Nude* para confirmar que, realmente, sigue un patrón de morfogénesis ramificada y formación de lumen; posteriormente, el timo de ratones que expresan FoxN1 pero carecen de linfocitos (timos *Ikaros* $-/-$ fetales y *NSG*); a continuación, la acción secuencial de FoxN1 y precursores linfoides analizando timos *Ikaros* $-/-$ fetales y postnatales y, por último, el timo *wt* en el que ambos elementos actúan simultáneamente, para entender como la presencia de FoxN1 y de células linfoides modifica el patrón básico inicial de desarrollo y cuál es el grado de implicación de cada

uno de ellos en la histogénesis del timo y la diferenciación de las diferentes poblaciones de TECs.

1. El desarrollo tímico está basado en un fenómeno de inhibición de la tubulogénesis.

1.1. El desarrollo del timo *Nude* responde a un proceso de tubulogénesis y morfogénesis ramificada.

Nuestros resultados demuestran que el desarrollo del timo *Nude* a partir de la masa epitelial pluriestratificada del esbozo tímico inicial implica procesos de proliferación, despolarización-polarización y estratificación-desestratificación que conducen a su remodelación, de forma que se desestratifica, elonga y ramifica a la vez que se define un lumen central ramificado y continuo. Por tanto, la cinética de formación del timo *Nude* implica la diferenciación a células apicales de las células de la masa epitelial, que conlleva, inicialmente, la expresión despolarizada de Cld3/4, su posterior polarización multifocal en diferentes puntos a lo largo de la zona central diferenciada de la masa epitelial y, finalmente, la coalescencia de los diferentes lúmenes y focos de polarización, definiendo un lumen central ramificado y continuo (ver figura 22 B). El crecimiento del lóbulo hasta alcanzar la organización del timo *Nude* adulto implica la desestratificación completa o casi completa de la estructura epitelial de manera que las capas intermedias se incorporarán al lumen, lo que conlleva, al mismo tiempo, la elongación y plegamiento de la estructura ramificada (ver figura 22 B).

Como introducíamos en la descripción del timo *Nude*, los resultados publicados previamente eran contradictorios y se limitaban a describir someramente su organización histológica. Dooley y colaboradores (*Dooley y cols., 2005b*) describían dos compartimentos en el timo *Nude*: uno formado por grandes quistes y otro glandular en la periferia de los mismos, mientras que Cordier (*Cordier, 1974*) hablaba solamente de la existencia de un epitelio monoestratificado con quistes dispersos limitados por células ciliadas, todo ello inmerso en una masa de tejido adiposo. Los resultados aquí descritos tiene una interpretación diferente a la que sólo se acercaron Dooley y

colaboradores (*Dooley y cols., 2005b*) mediante reconstrucciones de secciones seriadas del timo *Nude*. Estos autores demostraron que el compartimiento quístico dentro del rudimento tímico *Nude* está organizado como una sola unidad, con múltiples sáculos o canales interconectados, que se asemejaban al tejido pulmonar de ratones deficientes en *Nkx2.1*, cuyo desarrollo se detiene en la etapa denominada pseudoglandular (*Minoo y cols., 1999*).

Realmente, el desarrollo del timo *Nude* recuerda mucho al descrito para los conductos pancreáticos, donde, desde estadíos muy tempranos de la ontogenia, se producen procesos de estratificación-desestratificación y polarización-despolarización, que conllevan la remodelación del epitelio inicial y una tubulogénesis “de novo”, formándose, finalmente, el sistema ductal continuo y ramificado típico del páncreas mediante la coalescencia de microlúmenes (*Villaseñor y cols., 2010*), como nosotros describimos para el desarrollo del timo *Nude*.

Es conocido que multitud de órganos epiteliales se desarrollan en el embrión a partir de un sistema simple de túbulos que, a medida que maduran, ramifican dando finalmente complejas estructuras ramificadas (“tree-like structures”) (*Hogan y Kolodziej, 2002*), en un proceso conocido como morfogénesis ramificada o ramificante. De esta manera, se amplía el área disponible para la realización de las diferentes funciones del órgano como, por ejemplo, el intercambio de nutrientes y de gases, mientras que se reduce la distancia que las moléculas implicadas en dichos procesos tienen que recorrer. Aunque la organización histológica y las funciones de algunos de los órganos que se desarrollan según este proceso, como el riñón, la glándula mamaria, el pulmón y los vasos sanguíneos son, finalmente, muy distintas, los mecanismos, tanto celulares como moleculares, que suceden en las etapas iniciales implicadas en la formación de los túbulos son similares (*Hogan y Kolodziej, 2002*). Una de las características comunes a todos los órganos tubulares es que, en todos ellos, se muestra una polaridad celular ápico-basal, donde la superficie celular apical queda hacia el lumen central y la membrana basal unida a la matriz extracelular. La adquisición de esta polaridad es un evento decisivo para la tubulogénesis y la formación de lumen, e implica una serie de procesos dinámicos e interdependientes, como la reorganización de citoesqueleto, y la generación de uniones intercelulares (*Knust, 2000*) (fig. 84).

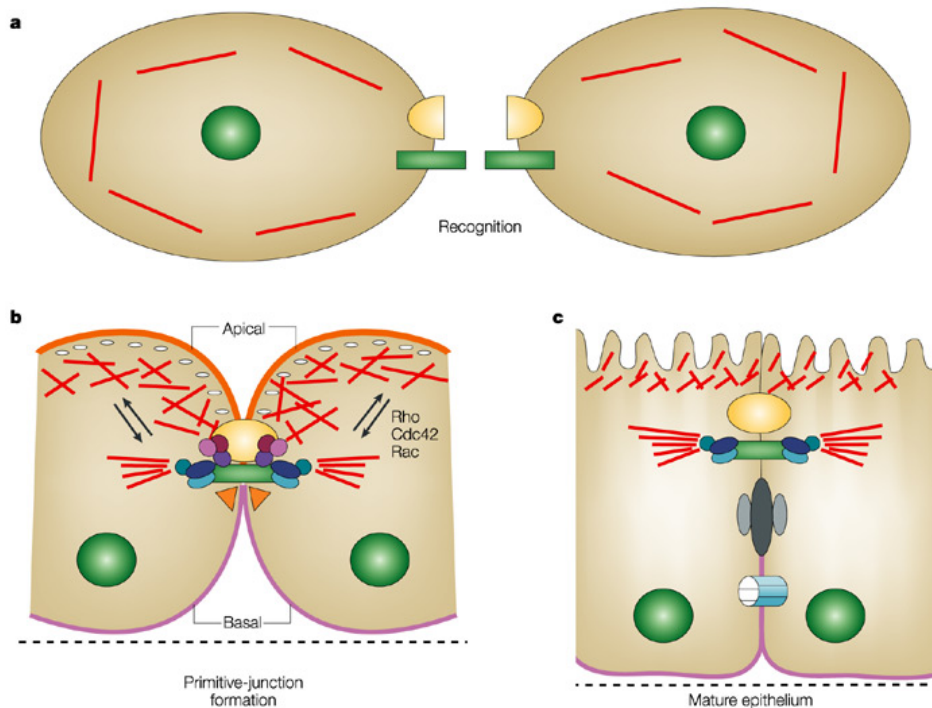


Figura 84. La adquisición de polaridad apico-basal es esencial para la formación de lumen. Procesos implicados en la maduración de los contactos entre dos células epiteliales. **A.** Dos células, con la F-actina (rojo) poco polarizada, contactan a través de interacciones homofílicas de E-cadherina (rectángulo verde). Otras moléculas como JAM, un componente de las uniones estrechas (amarillo), podrían estar también implicadas en la interacción. **B.** Consolidación de los contactos iniciales: las uniones adherentes se desarrollan y asocian a diversos complejos, modulados por señales que inducen el establecimiento de la polarización apical (línea naranja)-basal. En su parte basal (línea morada), las células se unen a la membrana basal (línea discontinua). **C.** El epitelio maduro tiene la F-actina (rojo) polarizada hacia la membrana apical y varios tipos de uniones celulares, todas ellas compuestas por proteínas de diferentes familias. Adaptado de Hogan y Kolodziej (2002).

Entre las estrategias descritas para el desarrollo de órganos tubulares, se encuentra la seguida por algunos como la glándula mamaria, la glándula salivar de mamíferos y el páncreas, que implica el desarrollo a partir de precursores primitivos que en principio no muestran ni polaridad apico-basal ni conexiones intercelulares especializadas (Hogg y cols., 1983; Hieda y cols., 1996; Nanba y cols., 2001) y forman primordios o yemas que forman un pequeño lumen en la zona central que crece a medida que avanza el desarrollo y en torno al cual se organizan y polarizan las células de la masa central. Como, al mismo tiempo, el rudimento del órgano epitelial ramifica, se forman múltiples lúmenes en numerosos focos en la zona central, que posteriormente coalescen, dando lugar a un lumen continuo (fig. 85).

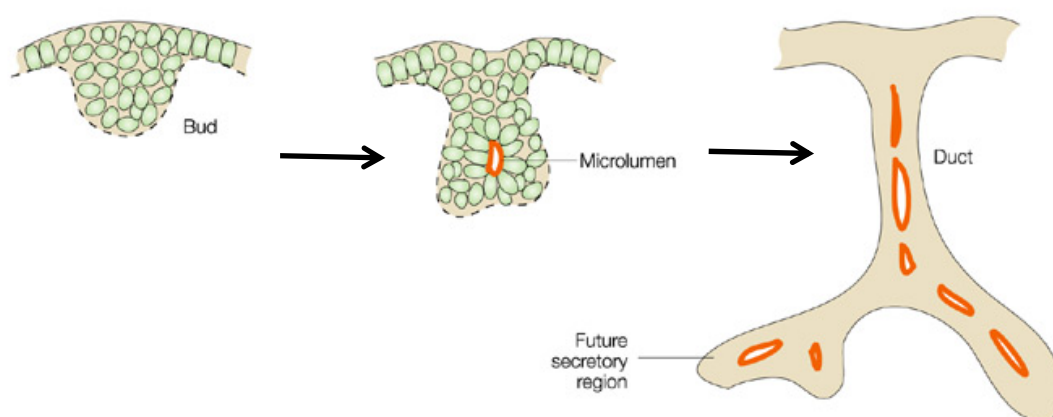


Figura 85. Tubulogénesis mediada por adquisición de polaridad celular ápico-basal y coalescencia de microlúmenes. Esquema de la formación del lumen en la glándula mamaria, la glándula salivar y el páncreas. Se observa una yema inicial formada por células inicialmente no polarizadas. Las células de la masa intermedia se polarizan en torno a un microlumen a medida que avanza el desarrollo. A medida que la estructura epitelial sigue ramificando se forman nuevos microlúmenes de forma multifocal, que terminarán coalesciendo para dar lugar a un lumen continuo (no mostrado). Adaptado de Hogan y Kolodziej (2002).

Una situación similar es la que nosotros observamos durante el desarrollo del timo *Nude* donde, a medida que avanza, las células de la masa intermedia regulan positivamente la expresión de Cld3/4 y se polarizan, formando una serie de lúmenes ciegos y microlúmenes que coalescerán entre ellos dando finalmente la estructura luminal continua y ramificada que se observa en el estadio adulto (ver fig. 22 B). Por tanto, dado que el proceso de formación del lumen ramificado en timos *Nude* acontece por un proceso de adquisición de polaridad ápico-basal, al igual que en órganos que se desarrollan por tubulogénesis y morfogénesis ramificada, y que el proceso de tubulogénesis observado en el timo *Nude* es similar al descrito para la glándula salivar, la glándula mamaria y el páncreas (Hogan y Kolodziej, 2002; Villaseñor y cols., 2010), podemos concluir que el desarrollo de la estructura ramificada con un lumen continuo en su interior observada en timos adultos *Nude* sucede por un proceso de tubulogénesis y morfogénesis ramificada y responde a los mecanismos esenciales descritos para estos fenómenos en otros órganos. En este proceso, algunos marcadores fenotípicos de la médula tímica pero no asociados a su función inmunológica, presentes en el timo *Nude* como son K5, MTS10 y UEA, se expresan

asociados a las células formadoras de lumen durante el desarrollo fetal. En el estadio adulto MTS10 y K5 se distribuyen de forma diferente mientras UEA mantiene la distribución apical.

1.2. La expresión de FoxN1 provoca un bloqueo parcial del proceso de tubulogénesis en el timo.

El análisis de timos alinoides *NSG* e *Ikaros*^{-/-} fetales, sin colonizar por progenitores linfoides, puso de manifiesto que en presencia de FoxN1 se producía inicialmente una diferenciación apical similar a la observada en el timo *Nude*, que implicaba la regulación positiva de la expresión de Cld3/4, MTS10 y K5 y, posteriormente, de UEA y la organización de una estructura ramificada, pero, no se formaba un lumen continuo ni había desestratificación del epitelio en torno a él. Esto es debido a que a partir de un determinado momento de la ontogenia, en torno a 15 dpc., la expresión de FoxN1 inhibe la diferenciación apical de las células de la masa intermedia impidiendo la regulación positiva de la expresión de Cld3/4 por parte de las mismas, aunque permitiendo la de otros marcadores apicales como MTS10 y K5, lo que lleva a la formación de un lumen discontinuo (ver fig. 79). Además la expresión de FoxN1 promueve el crecimiento de las capas intermedias Cld3/4⁻, lo que genera una estructura más engrosada donde las células apicales Cld3/4⁺ forman quistes con un lumen central o cordones, o rosetas, que definen microlúmenes o no, englobados en una región más amplia K5 y MTS10 positiva. Por lo tanto, la presencia de FoxN1 inhibe la tubulogénesis y la desestratificación u organización de unos pocos estratos celulares en torno a un lumen observados en el timo *Nude*, impidiendo la formación de túbulos con un lumen central continuo formado por coalescencia de múltiples focos luminales, lo que, por tanto, resulta en una estructura tímica más engrosada con presencia de focos luminales discontinuos.

La confirmación indirecta de que FoxN1 podría por sí solo inhibir el proceso de tubulogénesis y formación de lumen, y la desestratificación del epitelio tímico que conlleva este proceso proviene del análisis del fenotipo de ratones con expresión forzada de FoxN1 en otros epitelios tubulares (*Prowse y cols., 1999*). Estos autores

analizaron ratones transgénicos que expresaban FoxN1 bajo el promotor de la involucrina, una molécula presente en ciertos estratos de la epidermis, y mostraban fenotipos que se subdividen en severo y medio. Los animales de fenotipo severo morían tras el nacimiento y presentaban alteraciones en la piel relacionadas con el número de copias del transgen expresadas. Los de fenotipo más severo presentaban una piel tersa, húmeda y brillante y morían presumiblemente por su incapacidad para retener agua debido a alteraciones en la función barrera epidérmica. Histológicamente los ratones presentaban hiperplasia de la capa epidérmica basal, ausencia de un borde dermo/epidérmico definido, falta de adelgazamiento progresivo de las capas epidérmicas suprabasales y aumento de la formación de vacuolas en queratinocitos. Los ratones con fenotipo menos severo llegan al estadio adulto, pero muestran un alto grado de mortalidad debido a que sufren hidronefrosis. Ésta se produce por la ausencia de lumen en el uréter que presenta un engrosamiento del epitelio. Aunque los autores interpretan que este engrosamiento del epitelio de los uréteres oblitera su lumen, en estos ratones, el uréter forma un cordón macizo de menor diámetro que la luz del uréter formada en ratones *wildtype*. Puesto que la luz del uréter se forma en condiciones normales mediante un proceso de tubulogénesis, que en este caso implica apoptosis, que forma lumen abierto entre 15 y 16 dpc. (Mendelsohn, 2009), su obstrucción en estos ratones transgénicos que expresan FoxN1 bajo el promotor de la involucrina, podría deberse a la formación incompleta del lumen más que a su obliteración debida a un engrosamiento del epitelio, como sucede en los timos de ratones *NSG* e *Ikaros* $-/-$.

Hay otras evidencias indirectas de un papel de FoxN1 en la inhibición de la formación de lumen. Así, mutaciones que producen una inhibición del proceso de tubulogénesis resultan en fenotipos comparables al inducido por FoxN1 en timos alinoides comparado con la situación *Nude*. Este es el caso del intestino del pez cebra, donde la luz del tubo se forma, como sucede en el timo *Nude*, a partir de una masa de células no polarizadas. A medida que la embriogénesis progresa se generan de forma local focos de polarización que terminan formando un único clúster central en torno al cual las células se organizan, de manera que la membrana apical de cada una de ellas queda orientada hacia él. Finalmente, por retracción de las membranas apicales, se origina un único lumen central (fig. 86 A) (Horne-Badovinac y cols., 2001). La mutación

has genera en pez cebra defectos en muchos órganos epiteliales, tales como el corazón, los ojos y el intestino. En el caso del intestino en desarrollo el proceso de tubulogénesis se inhibe parcialmente, de manera que la formación de las uniones apicales se retrasa y resulta ineficaz, de manera que no todas alcanzan el centro de la masa celular (*Horne-Badovinac y cols., 2001*), dando lugar a un fenotipo muy similar al observado también en el intestino del pez cebra con mutación en el gen *tcf2* (*Bagnat y cols., 2007*). Debido a ello, en vez de originarse un único lumen central, se forman al mismo tiempo varios lúmenes no conectados (fig. 86 B), como sucede en los timos alinfoides *NSG* e *Ikaros* $-/-$ con la expresión de FoxN1.

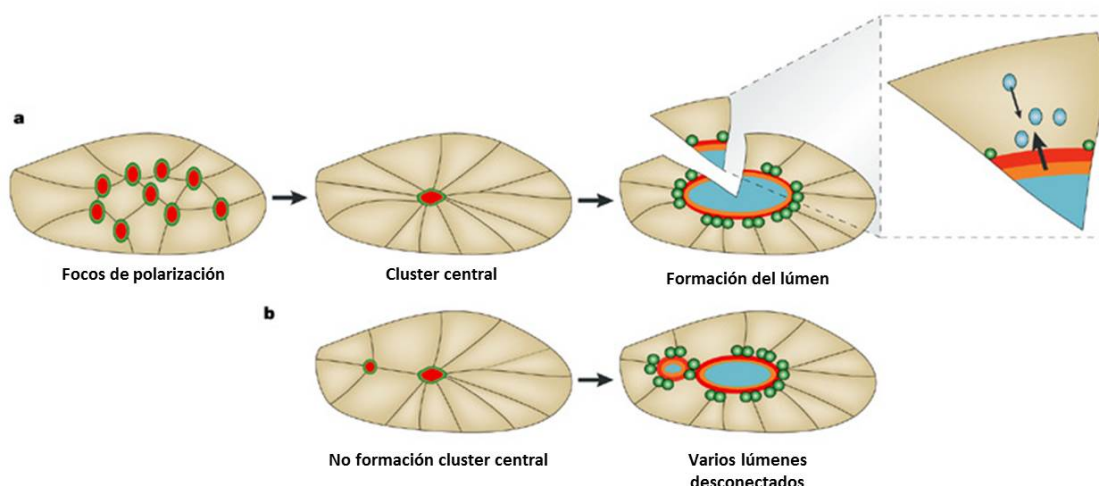


Figura 86. La mutación “*has*” en pez cebra afecta a la tubulogénesis del intestino, de manera que no se forma un único lumen central, sino varios lúmenes sin comunicación entre sí. A. Esquema de la tubulogénesis en el intestino wildtype del pez cebra: se forma un único lumen central a partir de la unión de múltiples focos de polarización por retracción de las membranas apicales de las células que se organizan en torno al mismo. B. Esquema de la tubulogénesis en el intestino del mutante “*has*” de pez cebra: los focos de polarización no se unen en la parte central, originándose varios lúmenes sin comunicación. Adaptado de Hogan y Kolodziej (2002).

2. La expresión de FoxN1 determina conjuntamente la inhibición de la tubulogénesis y la activación de un programa genético cortical que resultan en la especificación de la corteza y la médula tímicas.

Nuestros resultados muestran que la expresión de FoxN1 induce, directa o indirectamente, la aparición de genes asociados con la funcionalidad tímica como son MHC-II o DEC205, expresándose MHC-II en los dos compartimentos y siendo DEC205

un marcador cortical, ya que estas moléculas están presentes en los timos alinfoides estudiados (*NSG* e *Ikaros* $-/-$) pero no en los timos *Nude*. Sin embargo, estos mismos timos no expresan otros marcadores específicos de funcionalidad medular como son CD80 o AIRE. Hay un cierto consenso en que FoxN1 induce directa o indirectamente la expresión de genes relacionados con la función tímica, especialmente aquellos asociados con la corteza tímica. Así, se ha descrito que regula la expresión de CXCL12 y CCL25 (Bleul y Boehm, 2000; Koch y cols., 2008; Bajoghli y cols., 2009), quimiocinas implicadas en la migración de progenitores al primordio tímico y, dentro de éste, entre distintos territorios; de Dll4 y Dll1, ligandos de Notch, implicados en la determinación del compromiso T en dichos progenitores (Tsukamoto y cols., 2005). Además, FoxN1 regula directa o indirectamente la expresión de genes como catepsina L, CD40 y moléculas de clase II del MHC, exhibiendo respuestas distintas a dosis diferentes de la molécula (Nowell y cols., 2011). También $\beta 5t$, proteína específica del proteosoma de cTECs, está ausente en timos *Nude* pero se expresa a 12 dpc. tanto en timos *wt* como en aquellos de ratones dobles mutantes para CCR7 y CCR9 que apenas tienen colonización linfoide a esa edad pero expresan FoxN1 (Ripen y cols., 2011).

Respecto a la iniciación y progreso de la diferenciación del epitelio cortical se describió previamente que, en ratones transgénicos para la cadena CD3 ϵ humana que presentan un bloqueo del desarrollo linfoide en DN1, las cTECs de 15 dpc. no progresaban más allá del estadio inmaduro CD205+CD40-MHCII $-$, mientras que en ratones *Rag1* $-/-$, con bloqueo en DN3, las células epiteliales alcanzaban el estadio CD205+CD40+MHCII $+$, sugiriendo que mientras que la presencia de células DN1 no permitía la maduración del epitelio tímico las células DN3 sí lo hacían (Shakib y cols., 2009). Nuestros datos indican, sin embargo, que tanto MHC-II como DEC205 se expresan en timos alinfoides tanto *Ikaros* $-/-$ como *NSG*, y por tanto, en ausencia de progenitores linfoides. Un estudio más reciente mediante el análisis de timos de dos semanas de edad de ratones *Rag2* $^{-/-}$ *Il2rg* $^{-/-}$, también con bloqueo en DN1, ponía de manifiesto que aunque presentaban un bloqueo parcial del desarrollo epitelial en comparación a timos *Rag2* $-/-$, expresaban en su epitelio MHC-II y CD40 (Ribeiro y cols., 2014) y Nowell y colaboradores, observaron en timos con bajos niveles de expresión de FoxN1 que no eran colonizados por precursores hematopoyéticos en ningún momento de su desarrollo (*FoxN1* $^{R/-}$), expresión de DEC205 y MHC-II (Nowell y cols.,

2011). Nuestros resultados muestran que la expresión de MHC-II en timos alinfoides *NSG* e *Ikaros* $-/-$ a 15 dpc., el mismo estadio analizado por Shakib y colaboradores (Shakib y cols., 2009) para timos CD3 ϵ , concierne a una pequeña población celular, más o menos dispersa, situada en las zonas Cld3/4- centrales del timo, pero no en el resto del epitelio, lo que podría explicar que otros autores no fueran capaces de identificar una población celular MHCII+DEC205+, dada su baja representación, mediante citometría de flujo en timos CD3 ϵ a 15 dpc. Sin embargo, como se muestra en nuestros resultados, en estadios más avanzados del desarrollo, la expresión de MHC-II se extiende por todo el epitelio alinfoide a excepción de las zonas Cld3/4+.

Así pues, podemos presumir que FoxN1 inicia un programa genético que supone la expresión de una serie de genes funcionales tímicos, algunos comunes a corteza y médula, como MHC-II, y otros específicos de cTECs como DEC205, β 5t o catepsina L, pero no de genes específicos de médula como CD80 o AIRE.

En los ratones alinfoides, esta inducción de genes sucede a la vez que se inhibe el proceso de formación de lumen y la tubulogénesis, de manera que se genera un gradiente de diferenciación apical fundamentado en este proceso incompleto. Así, la inhibición de la tubulogénesis al tiempo que se mantiene o promueve la proliferación redundante en una distribución concéntrica de las células con un grado mayor de diferenciación apical en la zona central y menor o nulo en las zonas más basales. En la zona central, las células adquieren la expresión de Cld3/4 inicialmente de forma continua, pero a medida que el órgano crece se pierde esta continuidad. En la región circundante a las células Cld3/4+, las células inician la diferenciación apical regulando positivamente K5 y MTS10, mientras que las células situadas externamente a éstas no llegan a iniciar esta diferenciación. Sobre esta secuencia de diferenciación, se regula la diferenciación de genes funcionales de forma inversa a la diferenciación apical: las células más diferenciadas apicalmente Cld3/4+ quedan como DEC205-MHCII-; las siguientes, cuya diferenciación apical queda interrumpida en el estadio MTS10+Cld3/4-, quedan como DEC205-MHCII+ y las externas Cld3/4-MTS10- quedan como DEC205-MHCII+. Las más externas, la subcápsula tímica, quedan sin embargo como DEC205-MHCII+ (ver fig. 87).

Por tanto, en los estadios tempranos del desarrollo de los timos alinfoides, la diferenciación apical y la concomitante formación de lumen implica la regulación

positiva de Cld3/4, K5 y MTS10 en las células más centrales, como en el caso del timo *Nude*, y el inicio de la regulación positiva de DEC205 y MHC-II en la zona externa a éstas. Posteriormente, sin embargo, en un siguiente paso, las células periféricas a las células Cld3/4+ regulan positivamente la expresión de K5 y algo después la de MTS10 pero no la de Cld3/4, y lo hacen a partir de células que expresaban DEC205 y MHC-II, lo que supone la pérdida de expresión de DEC205. Por otra parte, y de forma simultánea, tiene lugar la formación de lumen de forma distal lo que implica éste mismo proceso repetido en una secuencia tronco-rama. La médula queda definida entonces, a partir de la acción de FoxN1, por la ausencia de expresión de genes corticales en las células Cld3/4+ y la ausencia de todos ellos, excepto MHC-II, en las células MTS10+, es decir en las células que han iniciado o avanzado más en una diferenciación apical. Además, nuestros resultados implican que, a medida que el programa de formación de lumen y tubulogénesis avanza, células que no han iniciado el proceso de formación de lumen pero sí han regulado positivamente genes corticales iniciarán esa diferenciación apical, perdiendo la expresión de estos genes. Es decir, las células medulares provienen en cierta medida, de células que han iniciado un programa cortical, como sugieren otros datos explicados más extensamente en la Introducción de este trabajo (*Baik y cols., 2013; Ohigashi y cols., 2013; Ribeiro y cols., 2014*), y por tanto, durante la ontogenia, la diferenciación corteza/médula se produce según un modelo de diferenciación seriada asimétrica en el que la diferenciación inducida por FoxN1 es la cortical por defecto, como se había sugerido previamente (*Alves y cols., 2014; Ohigashi y Takahama, 2014*) (figs. 87 y 88).

Esto significa que, en realidad, el programa de tubulogénesis inducido por otros factores y el de diferenciación cortical inducido por la expresión de FoxN1 son antagónicos. Mientras el primero potencia la tubulogénesis y la diferenciación apical mientras que bloquea la diferenciación cortical, el iniciado por FoxN1 bloquea la diferenciación apical y promueve la cortical. Existe presumiblemente, por tanto, un balance entre ambos programas que acaba generando la distribución concéntrica de corteza y médula, donde esta última se define, como hemos dicho, por la ausencia o la pérdida de expresión de marcadores corticales (fig. 87).

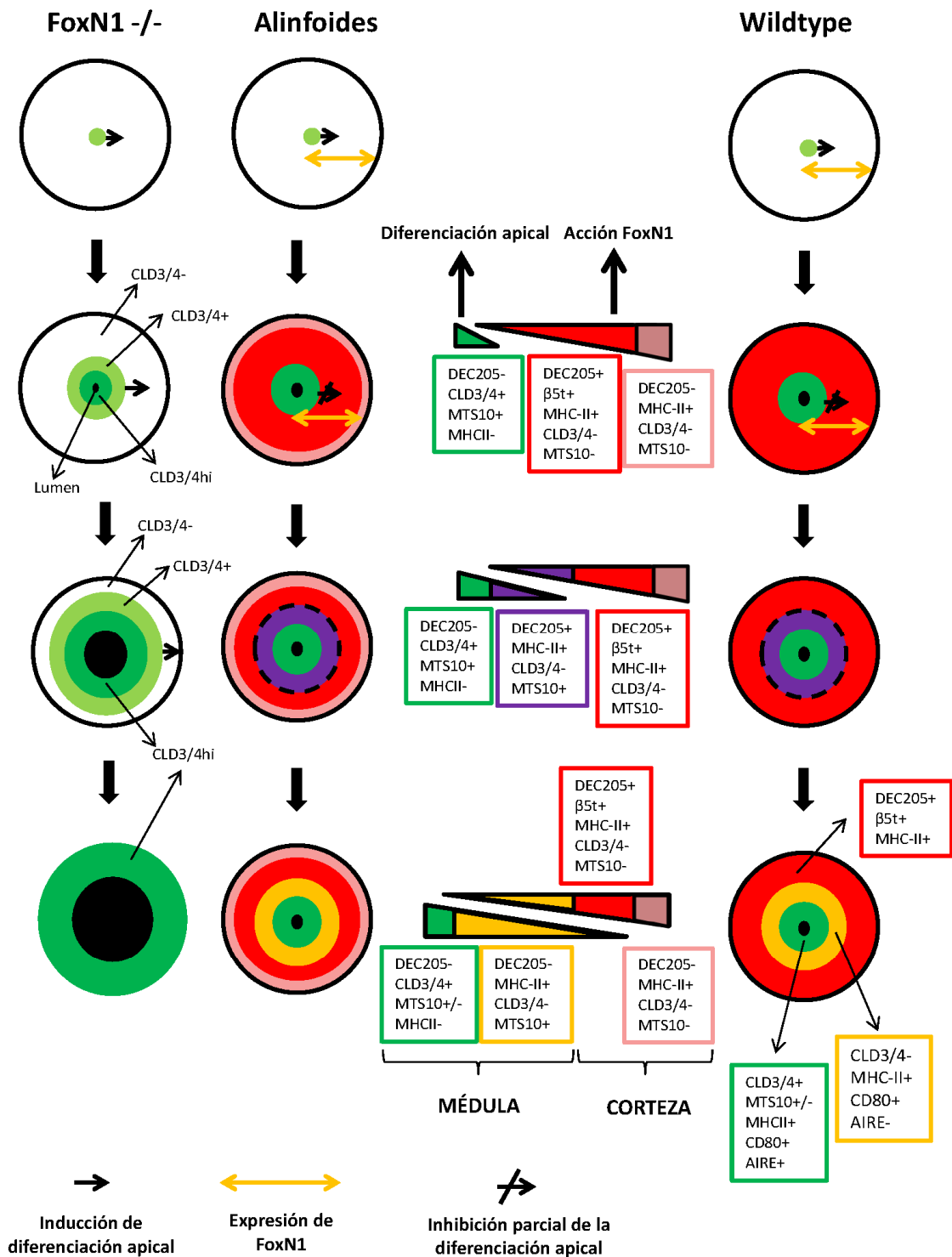


Figura 87. El programa genético de diferenciación apical y el de diferenciación cortical desencadenado por la expresión de FoxN1 son antagónicos y el equilibrio entre ambos determina el compromiso corteza/médula. En ausencia de FoxN1 el timo se desarrolla por un mecanismo de tubulogénesis en el que toda la masa intermedia inicial se diferencia a células apicales *Cld3/4^{hi}* polarizadas incorporándose a la formación de lumen. La expresión de FoxN1 (timos alinoides) desencadena un programa de diferenciación cortical, que entra en equilibrio antagónico con el de diferenciación apical, por el que

todas las células excepto las Cld3/4+ regulan positivamente la expresión de MHC-II y todas excepto éstas y la subcápsula (rosa) la de DEC205. Este equilibrio permite inicialmente un cierto grado de diferenciación a células apicales Cld3/4+ (verde), pero a partir de un determinado momento el proceso se inhibe, de manera que las células periféricas a las Cld3/4+ no regulan positivamente la expresión de Cld3/4 pero sí la de MTS10, quedando por tanto como MTS10+DEC205+MHCII+ (morado). El equilibrio entre los dos programas hace que, finalmente, en esta capa intermedia MTS10+DEC205+MHCII+ se pierda la expresión de DEC205, quedando finalmente como células MTS10+DEC205-MHCII+ (amarillo). Tanto la capa apical Cld3/4+ (verde) como la circundante MTS10+DEC205- (amarillo) son las que adquirirán marcadores específicos de médula como CD80 y/o AIRE en presencia de células linfoides (timos wildtype), mientras el resto del epitelio constituirá la corteza (rojo). Consiguientemente, el compromiso corteza/médula viene determinado por el equilibrio entre la diferenciación apical y la expresión de FoxN1, y parte de las células medulares provienen de células que han expresado marcadores corticales como DEC205.

En concordancia con nuestros resultados, Nowell y colaboradores (Nowell y cols., 2011), analizando el timo de ratones con un alelo hipomórfico modulable de FoxN1, que expresaban distintos niveles de la molécula, observaron que el factor de transcripción, aunque necesario para el desarrollo de ambos compartimentos tímicos, no parece participar directamente en la determinación del compromiso del progenitor epitelial común con el linaje medular, pero sí especifica o inicia el programa cortical. Sin embargo, estos autores interpretaron que el compromiso medular sucede independientemente de FoxN1. Basan su interpretación en la evidencia, también observada en nuestro trabajo, de la expresión de Cld3/4, K5 y UEA en las TECs de timos *Nude* (FoxN1 -/-) (Nowell y cols., 2011) que, como definieron Hamazaki y colaboradores, son las células que dan origen a la médula tímica (Hamazaki y cols., 2007). Estos autores consideran las células Cld3/4^{hi}UEA+ presentes en el timo de 13 dpc. los progenitores de las mTECs AIRE+, e identifican ya a 10,5 dpc. células Cld3/4+ en la parte apical del rudimento biestratificado tímico, que a 12,5 dpc. se sitúan en la parte central de pequeños grupúsculos MTS10+ distribuidos por todo el timo y a 13,5 dpc. expresan por primera vez UEA (Hamazaki y cols., 2007). Frente a esta interpretación, nuestros resultados muestran, sin embargo, que esta secuencia de maduración corresponde, realmente, al comienzo de la diferenciación apical y la formación de lumen, y que FoxN1 no activa un programa de diferenciación medular, sino que, en realidad, la médula se define por defecto, consecuencia de la falta de diferenciación cortical, inducida por FoxN1, en las células que inician este programa de diferenciación apical y formación de lumen. Por otro lado, este programa de

diferenciación medular no sucede en los timos alinfoides por lo que dependería de la presencia de células linfoides, como luego discutiremos.

En relación al origen del linaje medular, como ya hemos discutido, por una parte la cinética del proceso de formación de lumen explica un origen de las células medulares a partir de un precursor que ha iniciado una diferenciación cortical. Sin embargo, en los primeros estadios de desarrollo fetal aparecen células Cld3/4+MTS10+ antes de que se inicie esa diferenciación cortical y lo mismo sucede en las ramas distales que van diferenciando después. También se ha descrito que las células Cld3/4+ de 13,5 dpc. tienen capacidad de generar una médula completa, por lo que se han considerado precursores medulares fetales y se ha descrito una población Cld3/4+ con capacidad clonogénica cuya frecuencia disminuye con la edad (*Sekai y cols., 2014*). Todas las células de la masa epitelial inicial provienen del endodermo y, por tanto, de células Cld3/4+ (*Hamazaki y cols., 2007*) que proliferan dando lugar a células Cld3/4-, que forman una masa alrededor del lumen primario (*Muñoz y cols., 2014*). Aunque está descrito que este lumen primario se pierde (*Gordon y Manley, 2011*) nuestros resultados indican que no es así, sino que en los primeros estadios permanece y la masa epitelial crece a su alrededor. En cualquier caso, existen células formadoras de lumen Cld3/4+ desde muy temprano en el desarrollo. Como aquí se muestra, en los timos *Nude* las células Cld3/4+ dividen y, por tanto, podemos suponer que la formación de su estructura tubular depende tanto de la diferenciación apical de las células de la masa epitelial Cld3/4- como de la proliferación de las células Cld3/4+; es posible, por tanto, que en timos alinfoides y también en *wt*, parte de las células Cld3/4+ de estadios posteriores provengan de la proliferación de estas primeras. Si esto fuera así, en la médula una gran parte de las células Cld3/4+ provendrían de otras Cld3/4- o MTS10+ que, como ya se ha indicado, han iniciado la diferenciación cortical, pero posiblemente otras no. Sin embargo, las células Cld3/4+ constituirían un estadio inicial del linaje medular sólo en parte, ya que muchas de ellas en estadios posteriores y postnatales provendrían de células Cld3/4- medulares, y la mayoría de las células Cld3/4- medulares provienen de células que ya habían iniciado una diferenciación cortical (fig. 88).

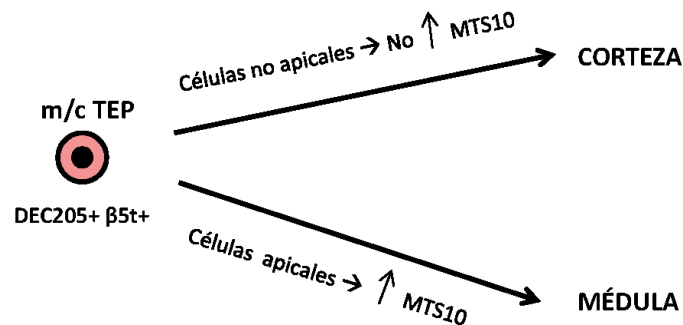
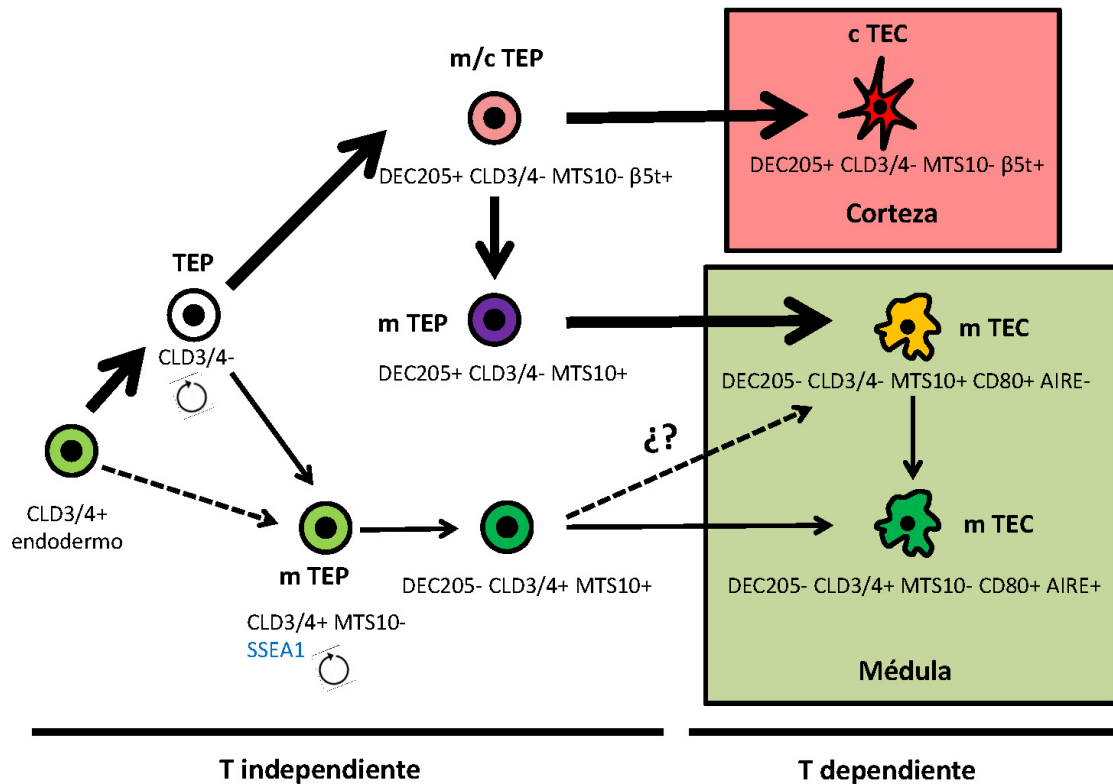


Figura 88. Modelo de diferenciación asimétrica seriada de los linajes medulares y corticales a partir del progenitor bipotente común. El esquema muestra que las células *Cld3/4*+ endodérmicas pierden la expresión de *Cld3/4*, aunque parte de ellas podrían mantenerla y terminar desarrollándose como mTECs. El progenitor bipotente *Cld3/4*- (TEP) tiene capacidad para generar ambos linajes, de manera que puede regular positivamente la expresión de *Cld3/4* e iniciar la diferenciación medular, o la de *DEC205* e iniciar la cortical. Sin embargo estas células *DEC205*+*Cld3/4*-*MTS10*- (m/c TEP) que ya han iniciado la diferenciación cortical tendrían capacidad, en función de su localización topológica en el epitelio, de dar finalmente corteza (posición no apical) o de pasar a engrosar el compartimento medular (posición apical). De esta manera las células situadas en posición apical regulan positivamente la expresión de *MTS10*, quedando como *DEC205*+*MTS10*+, perdiendo en estadios posteriores la expresión de *DEC205*, y adquiriendo, en presencia de precursores linfoides, la expresión de los marcadores medulares *AIRE* y/o *CD80*. Las líneas discontinuas indican posibles pasos en la diferenciación de poblaciones de las mTECs. Las líneas gruesas indican la ruta de diferenciación mayoritaria.

3. Papel de las células linfoides. Diferenciación de médula y maduración de corteza y médula.

Como muestran nuestros resultados, y ya hemos señalado, en ausencia de precursores linfoides no hay una diferenciación funcional del epitelio medular, ya que en timos alinfoides no hay mTECs especializadas en presentación antigénica (células CD80+) ni en producción de autoantígenos (células AIRE+). El análisis de timos *Ikaros*^{-/-} a partir de 3 días postnatal, momento en el que empiezan a ser colonizados por progenitores linfoides (*Wang y cols., 1996*), nos permitió evaluar el papel de las células linfoides para la maduración de las TECs en timos que hasta ese momento expresaban FoxN1 pero carecían de precursores linfoides y, por tanto, separadamente del papel ejercido por FoxN1. Los ratones *NSG* no presentan células T, B ni NK maduras en ningún momento durante su vida fetal ni postnatal, mientras los *Ikaros*^{-/-} carecen de precursores T fetales aunque presentan diferenciación normal de otros linajes en la vida fetal, y postnatalmente contienen precursores linfoides procedentes de la médula ósea que colonizan el timo y sufren una diferenciación T anormal (*Wang y cols., 1996*).

Como indican nuestros resultados, una vez que las células CD45+ se localizan en regiones colindantes con las células apicales Cld3/4+UEA^{hi}, éstas regulan positivamente la expresión de MHC-II y del regulador autoinmune AIRE, y tanto éstas como las que ocupan su periferia MTS10+UEA^{lo} la de CD80, especificándose por tanto a linaje medular funcional. Igualmente, el análisis de la ontogenia tímica de ratones *wildtype*, reveló que desde estadíos tan tempranos como 12,5 dpc. ya existen células CD45+ en el interior de los lóbulos tímicos en regiones colindantes con las células Cld3/4+, observándose ya a esta edad en tales timos expresión de MHC-II en las ramas más centrales, pero aún no en los extremos de las ramificaciones Cld3/4+. En estadíos más avanzados, concretamente a partir de 15,5 dpc. dónde el timo ya está completamente colonizado por células linfoides, todas las células apicales Cld3/4+UEA^{hi} y las de su región periférica MTS10+UEA^{lo} expresan MHC-II en su membrana, así como otros marcadores de función medular como AIRE (únicamente las Cld3/4+) y CD80. Esta inducción de la diferenciación medular funcional sucede, por tanto, en presencia de células linfoides presentes en los primeros estadíos del desarrollo normal del timo y en los primeros momentos tras la colonización postnatal.

Estos resultados confirman, por tanto, que los precursores linfoides son imprescindibles para la especificación de los TEP al linaje epitelial medular. Incluso cuando las condiciones de las células linfoides no son del todo normales parecen suficientes para la diferenciación medular. La diferenciación T que tiene lugar en los timos *Ikaros*^{-/-} colonizados postnatalmente es anormal y los que maduran al estadio CD4 SP (Wang y cols., 1996; Georgopoulos y cols., 1997) muestran una señal TCR reducida (Urban y cols., 2009). Sin embargo, como muestran nuestros resultados, aunque no sabemos si la señal reducida del TCR de los CD4 SP permite una correcta celularidad de las mTECs, los precursores linfoides que colonizan el timo *Ikaros*^{-/-} postnatalmente parecen suficientes al menos, para generar mTECs CD80+ y AIRE+ y para la generación de áreas medulares claramente definidas en el timo adulto.

Otros autores, mediante el análisis de timos con bloqueos en distintos momentos del desarrollo linfoide, han descrito incluso en ausencia de timocitos positivamente seleccionados la presencia de mTECs maduras que expresan AIRE y CD80 (Derbinski y cols., 2001; Rossi y cols., 2007b; Hikosaka y cols., 2008), aunque en número especialmente reducido en el caso de la ausencia de timocitos CD4 SP más que de CD8 SP (Irla y cols., 2008). Por tanto, las células CD4 SP son necesarias para un correcto desarrollo y celularidad de las mTECs AIRE+, pero qué células linfoides son las responsables de promover inicialmente la especificación de los progenitores epiteliales a linaje medular sigue sin estar del todo claro. Los datos disponibles indican que para iniciar el programa de diferenciación epitelial medular durante el desarrollo embrionario, y, con ello, la generación de las primeras mTECs AIRE+ a partir del progenitor epitelial, es necesaria la señalización vía RANKL procedente de, al menos, dos tipos celulares de origen linfoide presentes en el timo con anterioridad a la selección positiva: las células inductoras de tejido linfoide (LTIs) (Rossi y cols., 2007a; White y cols., 2008), importantes reguladores de la organogénesis de todos los tejidos linfoides (Mebius y cols., 1997; Sun y cols., 2000; Finke y cols., 2002; Eberl y cols., 2004) y las células T canónicas V γ 5⁺ (Roberts y cols., 2012), generadas en el timo embrionario y que expresan el complejo TcR $\gamma\delta$ antes del repertorio de células T que expresan el complejo TcR $\alpha\beta$. Sin embargo, debido a la presencia, aunque en un número muy reducido, de células AIRE+ en timos de ratones dobles KO para LTIs y células V γ 5⁺ (*Rorc*^{-/-} *Tcrd*^{-/-}) frente a su ausencia total en timos de ratones con bloqueo combinado

en células hematopoyéticas y LTIs (*CD3εtg26/Rorc*^{-/-}), no se puede descartar la posible implicación de otras células hematopoyéticas en este proceso (*Roberts y cols., 2012*).

Si relacionamos todos estos datos con los resultados obtenidos en este estudio, podríamos concluir que la especificación a médula y la diferenciación de los distintos tipos de mTECs vienen determinadas por tres factores. Por una parte una diferenciación apical de las células epiteliales inmaduras que implica la regulación positiva de la expresión de K5, MTS10 y, finalmente, de Cld3/4. Para que las células adquieran la expresión de AIRE es necesaria la diferenciación apical más completa, es decir, la regulación positiva de Cld3/4, mientras que CD80 se expresa tanto en células Cld3/4⁺ como en MTS10+Cld3/4⁻, lo que concuerda con datos previos que indican que las células expresan AIRE de forma terminal (*Gray y cols., 2007*). En segundo lugar, la acción de FoxN1, que inhibe la diferenciación apical y promueve la diferenciación cortical. En este caso, como ya hemos comentado, este equilibrio está desplazado hacia una mayor diferenciación apical y menor diferenciación cortical. En tercer lugar, podemos especular que este equilibrio desplazado hacia la no diferenciación cortical hace que las células apicales tengan, o bien contacto con células de origen linfóide diferentes a las que contactan con el epitelio cortical, o bien una respuesta diferencial a las mismas células. Es decir, la diferenciación apical podría implicar moléculas (quimiocinas, factores de crecimiento, etc) o interacciones célula a célula diferentes a las de las células no apicales de la corteza, que hace que las células linfoides que puedan entrar en contacto o mezclarse con ellas sean sólo unas concretas. Más posiblemente, sin embargo, las dos poblaciones celulares, podrían responder de diferente forma a señales provenientes de células de origen linfóide presentes en los primeros estadios de la diferenciación intratímica, tanto en el desarrollo fetal como en el timo adulto en la primera oleada de colonización postnatal proveniente de médula ósea, como demuestran los resultados obtenidos en el timo *Ikaros*^{-/-}. Como se ha explicado anteriormente, estas células son potencialmente tanto LTIs como células T canónicas Vγ5⁺, y presumiblemente algún otro tipo celular surgido en los primeros estadios de la diferenciación intratímica. Aparentemente la ruta esencial en esta diferenciación de la médula es la de NFκB (*Sun y cols., 2014*). Es importante, por tanto, definir si la ruta inducida por FoxN1 en la corteza es diferente de la de NFκB o si el

factor de transcripción modula esta ruta de forma diferente en ambos compartimentos tímicos.

La diferenciación posterior de la médula, una vez que aparecen timocitos SP al final del desarrollo fetal, pero sobre todo en el desarrollo postnatal, implica la pérdida de MTS10 en todas o casi todas las células Cld3/4+, la expansión fundamentalmente de las células Cld3/4-MTS10+, y la tridimensionalización de esta estructura de disposición concéntrica donde las células Cld3/4+MTS10+/- quedan en el centro y las Cld3/4-MTS10+ alrededor, para dar lugar a la médula adulta tal como previamente habíamos descrito (*Cejalvo y cols., 2014*) y como de acuerdo a los presentes resultados, sucede en el timo de ratones *Ikaros* -/- postnatales.

En el caso de la corteza, aunque los progenitores linfoides no son imprescindibles para su especificación como ya se ha descrito, sí parecen jugar un papel en su diferenciación. Como muestran nuestros resultados, aunque los timos NSG presentan marcadores corticales, una gran proporción de las células expresa el marcador MTS20, un marcador que se expresa en estadios tempranos del desarrollo y que se pierde a medida que este avanza (*Gill y cols., 2002*). Se ha considerado un marcador de inmadurez del epitelio y se ha podido generar un timo completo a partir de la población MTS20+ (*Bennett y cols., 2002*). Gray y colaboradores definieron dos subpoblaciones de cTECs en base a la expresión de MHC-II y Ly51: Ly51^{lo}MHCII^{lo} o Ly51^{hi}MHCII^{hi}. En timos *Rag* -/-, con un bloqueo del desarrollo T en el estadio DN3, la mayor parte de las cTECs son MHCII^{hi}Ly51^{hi} y faltan casi por completo cTECs Ly51^{lo}MHCII^{lo}; población que aparece mucho más representada en timos *TCRα* -/-, en los que la diferenciación T está bloqueada en la transición de DP a SP. Por tanto, en ausencia de linfocitos más allá del estadio DN3, la diferenciación de las cTECs quedaría detenida en el estadio MHCII^{hi}Ly51^{hi}, lo que sugiere que la aparición secuencial de los diferentes estadios de la diferenciación T daría lugar o expandiría específicamente la subpoblación Ly51^{lo}MHCII^{lo} (*Gray y cols., 2006*). El bloqueo de la diferenciación T en los primeros estadios de la diferenciación resulta también en alteraciones en las poblaciones corticales que quedan mayoritariamente como Dll4+ o IL7+, ambos marcadores expresados en los primeros estadios del desarrollo y restringidos a la región del borde corticomedular en el timo adulto (*Zamisch y cols., 2005; Fiorini y cols., 2008; Alves y cols., 2009a; Alves y cols., 2009b; Alves y cols., 2010;*

Ribeiro y cols., 2013). También linfocitos deficientes en ephrinas B1 y/o B2, implicadas en las interacciones timocitos-epitelio afectan el fenotipo y la distribución de estas poblaciones de cTECs (Cejalvo y cols., 2013).

Los precursores linfoides añaden otra modificación adicional a la introducida por la expresión de FoxN1, revirtiendo parcialmente la inhibición ejercida por el factor de transcripción en la diferenciación apical y la formación de lumen. Como hemos descrito, en timos *wt* durante el desarrollo temprano la formación de lumen es mayor que en el caso de timos alinfoides observándose mayor número de lúmenes, microlúmenes y canales de polarización. Por otra parte también muestran mayor continuidad del lumen o inicio de lumen que en el caso de los timos alinfoides, lo que explica que la continuidad de la médula sea mayor en el caso del timo *wt* que en el caso de ratones con defectos en la diferenciación T como apoyan otros trabajos previos (Anderson y cols., 2000; Irla y cols., 2013). En ellos se describe que la médula tímica *wt* constituye un gran compartimento central continuo de organización compleja y ramificada, con presencia de algunas pequeñas islas medulares alrededor aisladas o escasamente conectadas al compartimento central, mientras que el análisis de timos Rag2 ^{-/-} , con bloqueo en el desarrollo linfoide en DN3, y de timos carentes en timocitos CD4 SP (H2-Aa^{-/-}), revelan que el compartimento medular en ambos casos estaba formado por pequeñas islas medulares aisladas entre sí, lo que indica la importancia del desarrollo linfoide para el mantenimiento de la continuidad de la médula, como muestran nuestros resultados.

También nuestros resultados *in vitro*, aunque requieran un análisis en mayor profundidad, demuestran que en el timo *wt* permanece el programa genético de morfogénesis ramificada y formación de lumen. Indican que la presencia de células linfoides en el timo *wt* rescata parcialmente el efecto que tienen FGF7 y FGF10 sobre el crecimiento ramificado y la formación de lumen en el timo *Nude*, perdido en presencia de FoxN1. Ambos son factores conocidos por regular el crecimiento del timo (Revest y cols., 2001; Erickson y cols., 2002; Tsai y cols., 2003; Dooley y cols., 2007) y el de otros órganos con un patrón de desarrollo basado en una morfogénesis ramificada (Min y cols., 1998; Ohuchi y cols., 2000; Steinberg y cols., 2005). Por una parte es posible que los timocitos produzcan moléculas con implicación en estos procesos pero

también es posible que, de alguna manera, los timocitos también regulen la expresión de FoxN1 en las TECs.

4. Desarrollo fetal del epitelio tímico vs renovación postnatal.

Finalmente, como revelan nuestros resultados sobre el compromiso de linaje y la diferenciación cortical y medular durante la ontogenia, durante del desarrollo fetal la relación de linajes no es la misma en todos los estadios embrionarios, ya que el proceso de formación de lumen inhibido por la expresión de FoxN1 no progresa igual a lo largo de ellos, con lo que las células medulares Cld3/4+ o MTS10+ surgen de diferente forma al principio y al final del mismo. Además, en el estadio postnatal no tiene sentido hablar de un proceso de formación de lumen, sino que las células ya se han estabilizado en sus respectivas regiones. Esto hace pensar que, difícilmente, la renovación del epitelio tímico adulto tiene lugar por mecanismos similares a los de su desarrollo durante la ontogenia, como ya apuntan algunos trabajos recientes (*Ribeiro y cols., 2014*), por lo que es importante diferenciar las relaciones de linaje entre las células fetales y adultas. Por ejemplo, se ha descrito que la corteza adulta tiene capacidad de regeneración, por lo que se ha pensado que contiene precursores corticales (*Rode y Boehm, 2012*). Por otra parte se ha descrito recientemente una población medular con capacidad clonogénica Cld3/4+SSEA1+ (*Sekai y cols., 2014*) pero esta población presente en el desarrollo pierde esta capacidad clonogénica con la edad, por lo que no está claro que pudiera ser un progenitor medular adulto. También se ha descrito la presencia de un progenitor común postnatal bipotente (*Bleul y cols., 2006*) y el hecho de que se hayan encontrado células quiescentes sólo en el compartimento cortical se ha interpretado como la presencia de un precursor pluripotente también de origen cortical (*Dumont-Lagace y cols., 2014*). Por tanto, la relación de linajes celulares adultos aún no está clara ni tampoco la existencia o naturaleza de los progenitores comprometidos con corteza o médula. Sin embargo, al igual que sucede en otros órganos, independientemente del papel que jueguen en la renovación del tejido durante su homeostasis, sí parece que puedan existir células adultas quiescentes de tipo stem con capacidad para generar los linajes cortical y medular (*Wong y cols., 2014*). Cómo sucede la renovación normal del epitelio tímico

adulto y en su caso su regeneración o en qué condiciones pueden activarse células potencialmente stem con capacidad de regeneración es algo que debe ser aún investigado.

Conclusiones

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados presentados en este trabajo y de su discusión con los datos disponibles en la bibliografía podemos concluir que:

1. El epitelio del timo *Nude*, en ausencia de FoxN1 y precursores linfoides, se desarrolla según un programa genético de tubulogénesis y morfogénesis ramificada, basado en una diferenciación apical, similar al de otros órganos epiteliales ramificados.
2. La estructura tímica está basada en un proceso de inhibición de la tubulogénesis inducido por la expresión de FoxN1 que impide la polarización de las células de la masa epitelial y bloquea la formación de lumen. Esta inhibición implica un menor grado de diferenciación apical, de manera que impide la regulación positiva de Cld3/4 pero permite la de otros marcadores apicales como MTS10 y K5.
3. La expresión de FoxN1 induce un programa genético de diferenciación cortical independiente de la presencia de linfocitos, que tiene un equilibrio antagónico con el programa genético de diferenciación apical, inducido por otros factores y que es bloqueado por FoxN1.
4. El equilibrio antagónico entre estos dos programas determina el compromiso corteza/médula. Las células Cld3/4+ y su periferia MTS10+, que inician o avanzan más en una diferenciación apical se comprometen a linaje medular, mientras que el resto DEC205+MHCII+, sin diferenciación apical, se comprometen a linaje cortical.
5. La diferenciación corteza/médula sucede, por tanto, según un modelo de diferenciación asimétrica a partir de los progenitores presentes en una yema epitelial inicial. Gran parte de las células medulares provienen de TECs DEC205+, que, durante el desarrollo, regulan positivamente la expresión de

MTS10, mientras sufren diferenciación apical, y negativamente la de DEC205, por lo que, en gran medida, es una diferenciación seriada asimétrica.

6. La diferenciación medular tímica es dependiente de la presencia de precursores linfoides. Así, en presencia de células de origen linfoide presentes en el timo en los primeros estadios tras colonización tanto fetal como postnatal, las células Cld3/4+ con una diferenciación apical total adquieren la expresión de AIRE, mientras que tanto éstas como las periféricas MTS10+ adquieren la de CD80.
7. En timos *wildtype*, los tres procesos: desarrollo ramificado y formación de lumen, inhibición del mismo por FoxN1 e inicio de la diferenciación cortical y, finalmente, inducción de la diferenciación funcional medular por células linfoides tienen lugar simultáneamente, por lo que la adquisición de marcadores epiteliales tímicos durante la ontogenia tiene lugar secuencialmente en dirección proximal-distal a medida que el órgano crece y progresa el proceso de formación de lumen.
8. La presencia de linfocitos en el timo revierte en parte, aunque no completamente, el efecto inhibitorio de FoxN1 sobre el proceso de tubulogénesis, permitiendo la continuidad del compartimento medular.
9. Las células epiteliales tímicas fetales *wt* mantienen la capacidad para la formación de lumen *in vitro* y diferenciar dos poblaciones que segregan en el dominio apical y el basal.

Bibliografía

- Akiyama, T., Maeda, S., Yamane, S., Ogino, K., Kasai, M., Kajiura, F., Matsumoto, M., Inoue, J. (2005) Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science*, 308(5719), 248-51.
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J. M., Matsumoto, M., Nitta, T., Takahama, Y., Inoue, J. (2008) The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity*, 29(3), 423-37.
- Aliahmad, P., Kaye, J. (2006) Commitment issues: linking positive selection signals and lineage diversification in the thymus. *Immunol Rev*, 209(253-73).
- Alves, N. L., Richard-Le Goff, O., Huntington, N. D., Sousa, A. P., Ribeiro, V. S., Bordack, A., Vives, F. L., Peduto, L., Chidgey, A., Cumano, A., Boyd, R., Eberl, G., Di Santo, J. P. (2009a) Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(5), 1512-7.
- Alves, N. L., Huntington, N. D., Rodewald, H. R., Di Santo, J. P. (2009b) Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle". *Trends Immunol*, 30(10), 468-74.
- Alves, N. L., Huntington, N. D., Mention, J. J., Richard-Le Goff, O., Di Santo, J. P. (2010) Cutting Edge: a thymocyte-thymic epithelial cell cross-talk dynamically regulates intrathymic IL-7 expression in vivo. *J Immunol*, 184(11), 5949-53.
- Alves, N. L., Takahama, Y., Ohigashi, I., Ribeiro, A. R., Baik, S., Anderson, G., Jenkinson, W. E. (2014) Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur J Immunol*, 44(1), 16-22.
- Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2001) Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol*, 1(1), 31-40.
- Anderson, G., Jenkinson, W. E., Jones, T., Parnell, S. M., Kinsella, F. A., White, A. J., Pongracz, J. E., Rossi, S. W., Jenkinson, E. J. (2006) Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev*, 209(10-27).
- Anderson, M., Anderson, S. K., Farr, A. G. (2000) Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int Immunol*, 12(7), 1105-10.
- Anderson, M. S., Venzani, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., Von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., Mathis, D. (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298(5597), 1395-401.
- Arnold, J. S., Werling, U., Braunstein, E. M., Liao, J., Nowotschin, S., Edelmann, W., Hebert, J. M., Morrow, B. E. (2006) Inactivation of Tbx1 in the pharyngeal endoderm results in 22q11DS malformations. *Development*, 133(5), 977-87.

- Bagnat, M., Cheung, I. D., Mostov, K. E., Stainier, D. Y. (2007)** Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat Cell Biol*, 9(8), 954-60.
- Baik, S., Jenkinson, E. J., Lane, P. J., Anderson, G., Jenkinson, W. E. (2013)** Generation of both cortical and Aire(+) medullary thymic epithelial compartments from CD205(+) progenitors. *Eur J Immunol*, 43(3), 589-94.
- Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Hess, I., Rode, I., Netuschil, N., Tay, B. H., Venkatesh, B., Yu, J. K., Kaltenbach, S. L., Holland, N. D., Diekhoff, D., Happe, C., Schorpp, M., Boehm, T. (2009)** Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates. *Cell*, 138(1), 186-97.
- Balciunaite, G., Keller, M. P., Balciunaite, E., Piali, L., Zuklys, S., Mathieu, Y. D., Gill, J., Boyd, R., Sussman, D. J., Hollander, G. A. (2002)** Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol*, 3(11), 1102-8.
- Barcena, A., Galy, A. H., Punnonen, J., Muench, M. O., Schols, D., Roncarolo, M. G., De Vries, J. E., Spits, H. (1994)** Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+lineage- cells in human thymic organ culture. *J Exp Med*, 180(1), 123-32.
- Baribault, H., Price, J., Miyai, K., Oshima, R. G. (1993)** Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev*, 7(7A), 1191-202.
- Bennett, A. R., Farley, A., Blair, N. F., Gordon, J., Sharp, L., Blackburn, C. C. (2002)** Identification and characterization of thymic epithelial progenitor cells. *Immunity*, 16(6), 803-14.
- Benz, C., Heinzl, K., Bleul, C. C. (2004)** Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *Eur J Immunol*, 34(12), 3652-63.
- Blackburn, C. C., Augustine, C. L., Li, R., Harvey, R. P., Malin, M. A., Boyd, R. L., Miller, J. F., Morahan, G. (1996)** The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12), 5742-6.
- Blackburn, C. C., Manley, N. R. (2004)** Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol*, 4(4), 278-89.
- Bleul, C. C., Boehm, T. (2000)** Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol*, 30(12), 3371-9.
- Bleul, C. C., Boehm, T. (2001)** Laser capture microdissection-based expression profiling identifies PD1-ligand as a target of the nude locus gene product. *Eur J Immunol*, 31(8), 2497-503.

- Bleul, C. C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J. S., Boehm, T. (2006)** Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature*, 441(7096), 992-6.
- Bockman, D. E., Kirby, M. L. (1984)** Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. *Science*, 223(4635), 498-500.
- Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., Bleul, C. C. (2003)** Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med*, 198(5), 757-69.
- Bredenkamp, N., Nowell, C. S., Blackburn, C. C. (2014a)** Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*, 141(8), 1627-37.
- Bredenkamp, N., Ulyanchenko, S., O'Neill, K. E., Manley, N. R., Vaidya, H. J., Blackburn, C. C. (2014b)** An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 16(9), 902-8.
- Brisette, J. L., Li, J., Kamimura, J., Lee, D., Dotto, G. P. (1996)** The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev*, 10(17), 2212-21.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., Lo, D. (1995)** Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, 373(6514), 531-6.
- Burnley, P., Rahman, M., Wang, H., Zhang, Z., Sun, X., Zhuge, Q., Su, D. M. (2013)** Role of the p63-FoxN1 regulatory axis in thymic epithelial cell homeostasis during aging. *Cell Death Dis*, 4(e932).
- Candi, E., Rufini, A., Terrinoni, A., Giamboi-Miraglia, A., Lena, A. M., Mantovani, R., Knight, R., Melino, G. (2007)** DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 11999-2004.
- Carpenter, A. C., Bosselut, R. (2010)** Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*, 11(8), 666-73.
- Cejalvo, T., Munoz, J. J., Tobajas, E., Fanlo, L., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Zapata, A. (2013)** Ephrin-B-dependent thymic epithelial cell-thymocyte interactions are necessary for correct T cell differentiation and thymus histology organization: relevance for thymic cortex development. *J Immunol*, 190(6), 2670-81.
- Cejalvo, T., Munoz, J. J., Tobajas, E., Alfaro, D., Garcia-Ceca, J., Zapata, A. (2014)** Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts. *Histochem Cell Biol*.

- Ciofani, M., Schmitt, T. M., Ciofani, A., Michie, A. M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. L., Zuniga-Pflucker, J. C. (2004) Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol*, 172(9), 5230-9.
- Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., Von Boehmer, H., Zuniga-Pflucker, J. C. (2006) Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity*, 25(1), 105-16.
- Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J. C. (2006) A survival guide to early T cell development. *Immunol Res*, 34(2), 117-32.
- Corbeaux, T., Hess, I., Swann, J. B., Kanzler, B., Haas-Assenbaum, A., Boehm, T. (2010) Thymopoiesis in mice depends on a Foxn1-positive thymic epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(38), 16613-8.
- Cordier, A. C. (1974) Ultrastructure of the thymus in "Nude" mice. *J Ultrastruct Res*, 47(20), 26-40.
- Cordier, A. C., Heremans, J. F. (1975) Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. *Scand J Immunol*, 4(2), 193-6.
- Chen, L., Xiao, S., Manley, N. R. (2009) Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner. *Blood*, 113(3), 567-74.
- Cheng, L., Guo, J., Sun, L., Fu, J., Barnes, P. F., Metzger, D., Chambon, P., Oshima, R. G., Amagai, T., Su, D. M. (2010) Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic atrophy. *J Biol Chem*, 285(8), 5836-47.
- Chin, R. K., Lo, J. C., Kim, O., Blink, S. E., Christiansen, P. A., Peterson, P., Wang, Y., Ware, C., Fu, Y. X. (2003) Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression. *Nat Immunol*, 4(11), 1121-7.
- Chin, R. K., Zhu, M., Christiansen, P. A., Liu, W., Ware, C., Peltonen, L., Zhang, X., Guo, L., Han, S., Zheng, B., Fu, Y. X. (2006) Lymphotoxin pathway-directed, autoimmune regulator-independent central tolerance to arthritogenic collagen. *J Immunol*, 177(1), 290-7.
- Danzl, N. M., Jeong, S., Choi, Y., Alexandropoulos, K. (2014) Identification of novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and Traf6. *PLoS One*, 9(1), e86129.
- De Meis, J., Aurelio Farias-De-Oliveira, D., Nunes Panzenhagen, P. H., Maran, N., Villa-Verde, D. M., Morrot, A., Savino, W. (2012) Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases. *J Parasitol Res*, 2012(574020).

- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L. (2001)** Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2(11), 1032-9.
- Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenahn, M., Peltonen, L., Walter, J., Kyewski, B. (2005)** Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med*, 202(1), 33-45.
- Derbinski, J., Pinto, S., Rosch, S., Hexel, K., Kyewski, B. (2008)** Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(2), 657-62.
- Dias, S., Xu, W., McGregor, S., Kee, B. (2008)** Transcriptional regulation of lymphocyte development. *Curr Opin Genet Dev*, 18(5), 441-8.
- Dietrich, S., Gruss, P. (1995)** undulated phenotypes suggest a role of Pax-1 for the development of vertebral and extravertebral structures. *Dev Biol*, 167(2), 529-48.
- Dooley, J., Erickson, M., Farr, A. G. (2005a)** An organized medullary epithelial structure in the normal thymus expresses molecules of respiratory epithelium and resembles the epithelial thymic rudiment of nude mice. *J Immunol*, 175(7), 4331-7.
- Dooley, J., Erickson, M., Roelink, H., Farr, A. G. (2005b)** Nude thymic rudiment lacking functional foxn1 resembles respiratory epithelium. *Dev Dyn*, 233(4), 1605-12.
- Dooley, J., Erickson, M., Larochelle, W. J., Gillard, G. O., Farr, A. G. (2007)** FGFR2IIIb signaling regulates thymic epithelial differentiation. *Dev Dyn*, 236(12), 3459-71.
- Dooley, J., Erickson, M., Farr, A. G. (2008)** Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire-deficient thymus: implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J Immunol*, 181(8), 5225-32.
- Dooley, J., Erickson, M., Farr, A. G. (2009)** Lessons from thymic epithelial heterogeneity: FoxN1 and tissue-restricted gene expression by extrathymic, endodermally derived epithelium. *J Immunol*, 183(8), 5042-9.
- Dorshkind, K. (1990)** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol*, 8(111-37).
- Dumont-Lagace, M., Brochu, S., St-Pierre, C., Perreault, C. (2014)** Adult thymic epithelium contains non-senescent label-retaining cells. *J Immunol*, 192(5), 2219-26.
- Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M. J., Rennert, P. D., Choi, Y., Littman, D. R. (2004)** An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol*, 5(1), 64-73.

- Erickson, M., Morkowski, S., Lehar, S., Gillard, G., Beers, C., Dooley, J., Rubin, J. S., Rudensky, A., Farr, A. G. (2002) Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood*, 100(9), 3269-78.
- Farley, A. M., Morris, L. X., Vroegindeweij, E., Depreter, M. L., Vaidya, H., Stenhouse, F. H., Tomlinson, S. R., Anderson, R. A., Cupedo, T., Cornelissen, J. J., Blackburn, C. C. (2013) Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development*, 140(9), 2015-26.
- Farr, A. G., Anderson, S. K. (1985) Epithelial heterogeneity in the murine thymus: fucose-specific lectins bind medullary epithelial cells. *J Immunol*, 134(5), 2971-7.
- Farr, A. G., Dooley, J. L., Erickson, M. (2002) Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol Rev*, 189(20-7).
- Ferguson, B. J., Alexander, C., Rossi, S. W., Liiv, I., Rebane, A., Worth, C. L., Wong, J., Laan, M., Peterson, P., Jenkinson, E. J., Anderson, G., Scott, H. S., Cooke, A., Rich, T. (2008) AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J Biol Chem*, 283(3), 1723-31.
- Fiala, J. C. (2005) Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc*, 218(Pt 1), 52-61.
- Finke, D., Acha-Orbea, H., Mattis, A., Lipp, M., Kraehenbuhl, J. (2002) CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5. *Immunity*, 17(3), 363-73.
- Fiorini, E., Ferrero, I., Merck, E., Favre, S., Pierres, M., Luther, S. A., Macdonald, H. R. (2008) Cutting edge: thymic crosstalk regulates delta-like 4 expression on cortical epithelial cells. *J Immunol*, 181(12), 8199-203.
- Gabler, J., Arnold, J., Kyewski, B. (2007) Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*, 37(12), 3363-72.
- Garfin, P. M., Min, D., Bryson, J. L., Serwold, T., Edris, B., Blackburn, C. C., Richie, E. R., Weinberg, K. I., Manley, N. R., Sage, J., Viatour, P. (2013) Inactivation of the RB family prevents thymus involution and promotes thymic function by direct control of Foxn1 expression. *J Exp Med*, 210(6), 1087-97.
- Ge, Q., Zhao, Y. (2013) Evolution of thymus organogenesis. *Dev Comp Immunol*, 39(1-2), 85-90.
- Georgopoulos, K., Winandy, S., Avitahl, N. (1997) The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 15(155-76).

- Gill, J., Malin, M., Hollander, G. A., Boyd, R. (2002)** Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol*, 3(7), 635-42.
- Gillard, G. O., Farr, A. G. (2005)** Contrasting models of promiscuous gene expression by thymic epithelium. *J Exp Med*, 202(1), 15-9.
- Gillard, G. O., Dooley, J., Erickson, M., Peltonen, L., Farr, A. G. (2007)** Aire-dependent alterations in medullary thymic epithelium indicate a role for Aire in thymic epithelial differentiation. *J Immunol*, 178(5), 3007-15.
- Ginda, W. J., Jaroszewski, J., Warchol, J. B., Brelinska, R. (1994)** Three dimensional analysis of thymic medulla. *Folia Morphol (Warsz)*, 53(3), 157-64.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., Zlotnik, A. (1993)** A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*, 150(10), 4244-52.
- Gommeaux, J., Gregoire, C., Nguessan, P., Richelme, M., Malissen, M., Guerder, S., Malissen, B., Carrier, A. (2009)** Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes. *Eur J Immunol*, 39(4), 956-64.
- Gordon, J., Bennett, A. R., Blackburn, C. C., Manley, N. R. (2001)** Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mech Dev*, 103(1-2), 141-3.
- Gordon, J., Wilson, V. A., Blair, N. F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., Manley, N. R., Blackburn, C. C. (2004)** Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol*, 5(5), 546-53.
- Gordon, J., Patel, S. R., Mishina, Y., Manley, N. R. (2010)** Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev Biol*, 339(1), 141-54.
- Gordon, J., Manley, N. R. (2011)** Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development*, 138(18), 3865-78.
- Gossens, K., Naus, S., Corbel, S. Y., Lin, S., Rossi, F. M., Kast, J., Ziltener, H. J. (2009)** Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J Exp Med*, 206(4), 761-78.
- Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., Mathis, D. (2007)** Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J Exp Med*, 204(11), 2521-8.
- Gray, D. H., Chidgey, A. P., Boyd, R. L. (2002)** Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods*, 260(1-2), 15-28.

- Gray, D. H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C., Boyd, R. L. (2006) Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*, 108(12), 3777-85.
- Grevellec, A., Tucker, A. S. (2010) The pharyngeal pouches and clefts: Development, evolution, structure and derivatives. *Semin Cell Dev Biol*, 21(3), 325-32.
- Guo, J., Rahman, M., Cheng, L., Zhang, S., Tvinnereim, A., Su, D. M. (2011) Morphogenesis and maintenance of the 3D thymic medulla and prevention of nude skin phenotype require FoxN1 in pre- and post-natal K14 epithelium. *J Mol Med (Berl)*, 89(3), 263-77.
- Haara, O., Koivisto, T., Miettinen, P. J. (2009) EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells. *Differentiation*, 77(3), 298-306.
- Hale, L. P., Markert, M. L. (2004) Corticosteroids regulate epithelial cell differentiation and Hassall body formation in the human thymus. *J Immunol*, 172(1), 617-24.
- Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H. S., Matsumoto, M., Minato, N. (2007) Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat Immunol*, 8(3), 304-11.
- Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., Nagamine, K., Lagerstedt, A., Ovod, V., Ranki, A., Rantala, I., Nieminen, M., Tuukkanen, J., Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Shimizu, N., Krohn, K. (1999) Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(3), 821-5.
- Hetzer-Egger, C., Schorpp, M., Haas-Assenbaum, A., Balling, R., Peters, H., Boehm, T. (2002) Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*, 32(4), 1175-81.
- Hick, A. C., Van Eyll, J. M., Cordi, S., Forez, C., Passante, L., Kohara, H., Nagasawa, T., Vanderhaeghen, P., Courtoy, P. J., Rousseau, G. G., Lemaigre, F. P., Pierreux, C. E. (2009) Mechanism of primitive duct formation in the pancreas and submandibular glands: a role for SDF-1. *BMC Dev Biol*, 9(66).
- Hieda, Y., Iwai, K., Morita, T., Nakanishi, Y. (1996) Mouse embryonic submandibular gland epithelium loses its tissue integrity during early branching morphogenesis. *Dev Dyn*, 207(4), 395-403.
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J. M., Takayanagi, H., Yokota, Y., Yamada, H., Yoshikai, Y., Inoue, J., Akiyama, T., Takahama, Y. (2008) The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity*, 29(3), 438-50.

- Hogan, B. L., Kolodziej, P. A. (2002)** Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nat Rev Genet*, 3(7), 513-23.
- Hogg, N. A., Harrison, C. J., Tickle, C. (1983)** Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J Embryol Exp Morphol*, 73(39-57).
- Hollander, G. A. (2007)** Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat Immunol*, 8(3), 234-6.
- Horne-Badovinac, S., Lin, D., Waldron, S., Schwarz, M., Mbamalu, G., Pawson, T., Jan, Y., Stainier, D. Y., Abdelilah-Seyfried, S. (2001)** Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol*, 11(19), 1492-502.
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Hollander, G. A., Shima, D. T., Habu, S. (2008)** Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med*, 205(11), 2507-13.
- Hubert, F. X., Kinkel, S. A., Davey, G. M., Phipson, B., Mueller, S. N., Liston, A., Proietto, A. I., Cannon, P. Z., Forehan, S., Smyth, G. K., Wu, L., Goodnow, C. C., Carbone, F. R., Scott, H. S., Heath, W. R. (2011)** Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood*, 118(9), 2462-72.
- Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I. R., Hubert, F. X., Scott, H. S., Takahama, Y., Hollander, G. A., Reith, W. (2008)** Autoantigen-specific interactions with CD4+ thymocytes control mature medullary thymic epithelial cell cellularity. *Immunity*, 29(3), 451-63.
- Irla, M., Hollander, G., Reith, W. (2010)** Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4+ thymocytes. *Trends Immunol*, 31(2), 71-9.
- Irla, M., Guenot, J., Sealy, G., Reith, W., Imhof, B. A., Serge, A. (2013)** Three-dimensional visualization of the mouse thymus organization in health and immunodeficiency. *J Immunol*, 190(2), 586-96.
- Itoi, M., Kawamoto, H., Katsura, Y., Amagai, T. (2001)** Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage. *Int Immunol*, 13(9), 1203-11.
- Itoi, M., Tsukamoto, N., Amagai, T. (2007)** Expression of Dll4 and CCL25 in Foxn1-negative epithelial cells in the post-natal thymus. *Int Immunol*, 19(2), 127-32.
- Jaskoll, T., Zhou, Y. M., Chai, Y., Makarenkova, H. P., Collinson, J. M., West, J. D., Hajihosseini, M. K., Lee, J., Melnick, M. (2002)** Embryonic submandibular gland morphogenesis: stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in FgfR2-IIIc(+/-Delta), BMP7(-/-) and Pax6(-/-) mice. *Cells Tissues Organs*, 170(2-3), 83-98.

- Jenkinson, W. E., Rossi, S. W., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2005)** Development of functional thymic epithelial cells occurs independently of lymphostromal interactions. *Mech Dev*, 122(12), 1294-9.
- Jenkinson, W. E., Bacon, A., White, A. J., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2008)** An epithelial progenitor pool regulates thymus growth. *J Immunol*, 181(9), 6101-8.
- Jenkinson, W. E., Nakamura, K., White, A. J., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2012)** Normal T cell selection occurs in CD205-deficient thymic microenvironments. *PLoS One*, 7(12), e53416.
- Jerome, L. A., Papaioannou, V. E. (2001)** DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet*, 27(3), 286-91.
- Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., Takahama, Y., Sakaguchi, S., Mitani, T., Matsumoto, M. (2004)** NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol*, 172(4), 2067-75.
- Kaufmann, E., Knochel, W. (1996)** Five years on the wings of fork head. *Mech Dev*, 57(1), 3-20.
- Kingston, R., Jenkinson, E. J., Owen, J. J. (1984)** Characterization of stromal cell populations in the developing thymus of normal and nude mice. *Eur J Immunol*, 14(11), 1052-6.
- Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, M. (2006)** Essential role of IkappaB kinase alpha in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J Immunol*, 176(7), 3995-4002.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B. (2009)** Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol*, 9(12), 833-44.
- Klein, L., Jovanovic, K. (2011)** Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin Immunol*, 23(6), 401-9.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. (2014)** Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14(6), 377-91.
- Klug, D. B., Carter, C., Crouch, E., Roop, D., Conti, C. J., Richie, E. R. (1998)** Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11822-7.

- Klug, D. B., Carter, C., Gimenez-Conti, I. B., Richie, E. R. (2002) Cutting edge: thymocyte-independent and thymocyte-dependent phases of epithelial patterning in the fetal thymus. *J Immunol*, 169(6), 2842-5.
- Knust, E. (2000) Control of epithelial cell shape and polarity. *Curr Opin Genet Dev*, 10(5), 471-5.
- Koble, C., Kyewski, B. (2009) The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med*, 206(7), 1505-13.
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N. R., Duarte, A., Macdonald, H. R., Radtke, F. (2008) Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med*, 205(11), 2515-23.
- Laky, K., Fowlkes, B. J. (2008) Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr Opin Immunol*, 20(2), 197-202.
- Lal-Nag, M., Morin, P. J. (2009) The claudins. *Genome Biol*, 10(8), 235.
- Le Douarin, N. M., Jotereau, F. V. (1975) Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med*, 142(1), 17-40.
- Le Lievre, C. S., Le Douarin, N. M. (1975) Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 34(1), 125-54.
- Lei, Y., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L. T., Bosl, M. R., Hollander, G. A., Hayashi, Y., Malefyt Rde, W., Nitta, T., Takahama, Y. (2011) Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med*, 208(2), 383-94.
- Lifschitz-Mercer, B., Fogel, M., Moll, R., Jacob, N., Kushnir, I., Livoff, A., Waldherr, R., Franke, W. W., Czernobilsky, B. (1991) Intermediate filament protein profiles of human testicular non-seminomatous germ cell tumors: correlation of cytokeratin synthesis to cell differentiation. *Differentiation*, 48(3), 191-8.
- Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E., Petrie, H. T. (2001) Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*, 194(2), 127-34.
- Lindsay, E. A. (2001) Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet*, 2(11), 858-68.
- Liu, G., Wang, L., Pang, T., Zhu, D., Xu, Y., Wang, H., Cong, X., Liu, Y. (2014) Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells regulate thymic epithelial cell development and function in Foxn1(-/-) mice. *Cell Mol Immunol*, 11(3), 275-84.

- Lkhagvasuren, E., Sakata, M., Ohigashi, I., Takahama, Y.** Lymphotoxin beta receptor regulates the development of CCL21-expressing subset of postnatal medullary thymic epithelial cells. *J Immunol*, 190(10), 5110-7.
- Lomada, D., Liu, B., Coghlan, L., Hu, Y., Richie, E. R. (2007)** Thymus medulla formation and central tolerance are restored in IKKalpha^{-/-} mice that express an IKKalpha transgene in keratin 5+ thymic epithelial cells. *J Immunol*, 178(2), 829-37.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., Malissen, B. (1992)** Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today*, 13(8), 315-22.
- Manley, N. R., Capecchi, M. R. (1995)** The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development*, 121(7), 1989-2003.
- Manley, N. R. (2000)** Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. *Semin Immunol*, 12(5), 421-8.
- Manley, N. R., Blackburn, C. C. (2003)** A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from? *Curr Opin Immunol*, 15(2), 225-32.
- Martins, V. C., Boehm, T., Bleul, C. C. (2008)** Ltbetar signaling does not regulate Aire-dependent transcripts in medullary thymic epithelial cells. *J Immunol*, 181(1), 400-7.
- Masuda, K., Itoi, M., Amagai, T., Minato, N., Katsura, Y., Kawamoto, H. (2005)** Thymic anlage is colonized by progenitors restricted to T, NK, and dendritic cell lineages. *J Immunol*, 174(5), 2525-32.
- Mathis, D., Benoist, C. (2009)** Aire. *Annu Rev Immunol*, 27(287-312).
- Mebius, R. E., Rennert, P., Weissman, I. L. (1997)** Developing lymph nodes collect CD4⁺CD3⁻LTbeta⁺ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity*, 7(4), 493-504.
- Mecklenburg, L., Tychsen, B., Paus, R. (2005)** Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol*, 14(11), 797-810.
- Mendelsohn, C. (2009)** Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. *Organogenesis*, 5(1), 306-14.
- Metzger, T. C., Khan, I. S., Gardner, J. M., Mouchess, M. L., Johannes, K. P., Krawisz, A. K., Skrzypczynska, K. M., Anderson, M. S. (2013)** Lineage tracing and cell ablation identify a post-Aire-expressing thymic epithelial cell population. *Cell Rep*, 5(1), 166-79.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., Derosé, M., Simonet, W. S. (1998)** Fgf-10 is required for both limb and lung

- development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev*, 12(20), 3156-61.
- Minoo, P., Su, G., Drum, H., Bringas, P., Kimura, S. (1999)** Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Dev Biol*, 209(1), 60-71.
- Mohtashami, M., Zuniga-Pflucker, J. C. (2006)** Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol*, 176(2), 730-4.
- Montecino-Rodriguez, E., Johnson, A., Dorshkind, K. (1996)** Thymic stromal cells can support B cell differentiation from intrathymic precursors. *J Immunol*, 156(3), 963-7.
- Mori, K., Itoi, M., Tsukamoto, N., Amagai, T. (2010)** Foxn1 is essential for vascularization of the murine thymus anlage. *Cell Immunol*, 260(2), 66-9.
- Mouri, Y., Yano, M., Shinzawa, M., Shimo, Y., Hirota, F., Nishikawa, Y., Nii, T., Kiyonari, H., Abe, T., Uehara, H., Izumi, K., Tamada, K., Chen, L., Penninger, J. M., Inoue, J., Akiyama, T., Matsumoto, M. (2011)** Lymphotoxin signal promotes thymic organogenesis by eliciting RANK expression in the embryonic thymic stroma. *J Immunol*, 186(9), 5047-57.
- Muñoz, J. J., Cejalvo, T., Tobajas, E., Fanlo, L., Cortes, A., Zapata, A. G. (2014)** 3D Immunofluorescence analysis of early thymic morphogenesis and medulla development. *Histol Histopathol*.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., Tanaka, K. (2007)** Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*, 316(5829), 1349-53.
- Nanba, D., Nakanishi, Y., Hieda, Y. (2001)** Changes in adhesive properties of epithelial cells during early morphogenesis of the mammary gland. *Dev Growth Differ*, 43(5), 535-44.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., Klein, L. (2008)** Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*, 455(7211), 396-400.
- Nehls, M., Kyewski, B., Messerle, M., Waldschutz, R., Schuddekopf, K., Smith, A. J., Boehm, T. (1996)** Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science*, 272(5263), 886-9.
- Nelson, A. J., Hosier, S., Brady, W., Linsley, P. S., Farr, A. G. (1993)** Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J Immunol*, 151(5), 2453-61.

- Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kitajima, H., Miyazaki, J., Kawamoto, H., Mouri, Y., Matsumoto, M. (2010)** Biphasic Aire expression in early embryos and in medullary thymic epithelial cells before end-stage terminal differentiation. *J Exp Med*, 207(5), 963-71.
- Nitta, T., Nitta, S., Lei, Y., Lipp, M., Takahama, Y. (2009)** CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(40), 17129-33.
- Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., Takahama, Y. (2010)** Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity*, 32(1), 29-40.
- Nogawa, H., Takahashi, Y. (1991)** Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development*, 112(3), 855-61.
- Nowell, C. S., Bredenkamp, N., Tetelin, S., Jin, X., Tischner, C., Vaidya, H., Sheridan, J. M., Stenhouse, F. H., Heussen, R., Smith, A. J., Blackburn, C. C. (2011)** Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet*, 7(11), e1002348.
- Ohigashi, I., Zuklys, S., Sakata, M., Mayer, C. E., Zhanybekova, S., Murata, S., Tanaka, K., Hollander, G. A., Takahama, Y. (2013)** Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from beta5t-expressing progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(24), 9885-90.
- Ohigashi, I., Takahama, Y. (2014)** CCRL1 marks heterogeneity in cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol*.
- Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N. (2000)** FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*, 277(3), 643-9.
- Ortman, C. L., Dittmar, K. A., Witte, P. L., Le, P. T. (2002)** Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol*, 14(7), 813-22.
- Palmer, E. (2003)** Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 3(5), 383-91.
- Pan, B., Liu, J., Zhang, Y., Sun, Y., Wu, Q., Zhao, K., Zeng, L., Xu, K. (2014)** Acute ablation of DP thymocytes induces up-regulation of IL-22 and Foxn1 in TECs. *Clin Immunol*, 150(1), 101-8.

- Patel, N., Sharpe, P. T., Miletich, I. (2011)** Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Dev Biol*, 358(1), 156-67.
- Penit, C. (1988)** Localization and phenotype of cycling and post-cycling murine thymocytes studied by simultaneous detection of bromodeoxyuridine and surface antigens. *J Histochem Cytochem*, 36(5), 473-8.
- Penit, C., Vasseur, F. (1989)** Cell proliferation and differentiation in the fetal and early postnatal mouse thymus. *J Immunol*, 142(10), 3369-77.
- Petrie, H. T. (2003)** Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol*, 3(11), 859-66.
- Petrie, H. T., Zuniga-Pflucker, J. C. (2007)** Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*, 25(649-79).
- Pignata, C., D'agostino, A., Finelli, P., Fiore, M., Scotese, I., Cosentini, E., Cuomo, C., Venuta, S. (1996a)** Progressive deficiencies in blood T cells associated with a 10p12-13 interstitial deletion. *Clin Immunol Immunopathol*, 80(1), 9-15.
- Pignata, C., Fiore, M., Guzzetta, V., Castaldo, A., Sebastio, G., Porta, F., Guarino, A. (1996b)** Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet*, 65(2), 167-70.
- Pignata, C. (2002)** A lesson for unraveling complex aspects of novel immunodeficiencies from the human equivalent of the nude/SCID phenotype. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(2), 409-14.
- Plachot, C., Chaboub, L. S., Adissu, H. A., Wang, L., Urazaev, A., Sturgis, J., Asem, E. K., Lelievre, S. A. (2009)** Factors necessary to produce basoapical polarity in human glandular epithelium formed in conventional and high-throughput three-dimensional culture: example of the breast epithelium. *BMC Biol*, 7(77).
- Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2003)** Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol*, 33(7), 1949-56.
- Porritt, H. E., Gordon, K., Petrie, H. T. (2003)** Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med*, 198(6), 957-62.
- Prockop, S. E., Petrie, H. T. (2004)** Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. *J Immunol*, 173(3), 1604-11.
- Prowse, D. M., Lee, D., Weiner, L., Jiang, N., Magro, C. M., Baden, H. P., Brissette, J. L. (1999)** Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol*, 212(1), 54-67.

- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M., Peltonen, L. (2002) Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet*, 11(4), 397-409.
- Reeh, K. A., Cardenas, K. T., Bain, V. E., Liu, Z., Laurent, M., Manley, N. R., Richie, E. R. (2014) Ectopic TBX1 suppresses thymic epithelial cell differentiation and proliferation during thymus organogenesis. *Development*, 141(15), 2950-8.
- Revest, J. M., Suniara, R. K., Kerr, K., Owen, J. J., Dickson, C. (2001) Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol*, 167(4), 1954-61.
- Ribeiro, A. R., Rodrigues, P. M., Meireles, C., Di Santo, J. P., Alves, N. L. (2013) Thymocyte selection regulates the homeostasis of IL-7-expressing thymic cortical epithelial cells in vivo. *J Immunol*, 191(3), 1200-9.
- Ribeiro, A. R., Meireles, C., Rodrigues, P. M., Alves, N. L. (2014) Intermediate expression of CCRL1 reveals novel subpopulations of medullary thymic epithelial cells that emerge in the postnatal thymus. *Eur J Immunol*.
- Ripen, A. M., Nitta, T., Murata, S., Tanaka, K., Takahama, Y. (2011) Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit beta5t. *Eur J Immunol*, 41(5), 1278-87.
- Roberts, N. A., White, A. J., Jenkinson, W. E., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, D. R., McConnell, F. M., Desanti, G. E., Benezech, C., Parnell, S. M., Cunningham, A. F., Paolino, M., Penninger, J. M., Simon, A. K., Nitta, T., Ohigashi, I., Takahama, Y., Caamano, J. H., Hayday, A. C., Lane, P. J., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2012) Rank signaling links the development of invariant gammadelta T cell progenitors and Aire(+) medullary epithelium. *Immunity*, 36(3), 427-37.
- Rode, I., Boehm, T. (2012) Regenerative capacity of adult cortical thymic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(9), 3463-8.
- Rodewald, H. R., Paul, S., Haller, C., Bluethmann, H., Blum, C. (2001) Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature*, 414(6865), 763-8.
- Rodewald, H. R. (2008) Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*, 26(355-88.
- Roman, E., Shino, H., Qin, F. X., Liu, Y. J. (2010) Cutting edge: Hematopoietic-derived APCs select regulatory T cells in thymus. *J Immunol*, 185(7), 3819-23.
- Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Giardino, G., Gallo, V., Del Vecchio, L., Pignata, C. (2013) FOXP1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program. *Front Immunol*, 4(187.

- Rooke, R., Waltzinger, C., Benoist, C., Mathis, D. (1997) Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity*, 7(1), 123-34.
- Rossi, S. W., Jenkinson, W. E., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2006) Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature*, 441(7096), 988-91.
- Rossi, S. W., Kim, M. Y., Leibbrandt, A., Parnell, S. M., Jenkinson, W. E., Glanville, S. H., McConnell, F. M., Scott, H. S., Penninger, J. M., Jenkinson, E. J., Lane, P. J., Anderson, G. (2007a) RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med*, 204(6), 1267-72.
- Rossi, S. W., Jeker, L. T., Ueno, T., Kuse, S., Keller, M. P., Zuklys, S., Gudkov, A. V., Takahama, Y., Krenger, W., Blazar, B. R., Hollander, G. A. (2007b) Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood*, 109(9), 3803-11.
- Rothenberg, E. V., Moore, J. E., Yui, M. A. (2008) Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 9-21.
- Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S., Zamoyska, R. (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev*, 228(1), 9-22.
- Sanchez, M. J., Muench, M. O., Roncarolo, M. G., Lanier, L. L., Phillips, J. H. (1994) Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med*, 180(2), 569-76.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-82.
- Schmid, B., Schindelin, J., Cardona, A., Longair, M., Heisenberg, M. (2010) A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics*, 11(274).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671-5.
- Schnell, F. J., Zoller, A. L., Patel, S. R., Williams, I. R., Kersh, G. J. (2006) Early growth response gene 1 provides negative feedback to inhibit entry of progenitor cells into the thymus. *J Immunol*, 176(8), 4740-7.
- Schorpp, M., Hofmann, M., Dear, T. N., Boehm, T. (1997) Characterization of mouse and human nude genes. *Immunogenetics*, 46(6), 509-15.

- Schuurman, H. J., Van Wichen, D., De Weger, R. A. (1989)** Expression of activation antigens on thymocytes in the 'common thymocyte' stage of differentiation. *Thymus*, 14(1-3), 43-53.
- Seach, N., Ueno, T., Fletcher, A. L., Lowen, T., Mattesich, M., Engwerda, C. R., Scott, H. S., Ware, C. F., Chidgey, A. P., Gray, D. H., Boyd, R. L. (2008)** The lymphotoxin pathway regulates Aire-independent expression of ectopic genes and chemokines in thymic stromal cells. *J Immunol*, 180(8), 5384-92.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S. (1999)** Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol*, 17(829-74).
- Sekai, M., Hamazaki, Y., Minato, N. (2014)** Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance. *Immunity*, 41(5), 753-61.
- Senoo, M., Pinto, F., Crum, C. P., Mckee, F. (2007)** p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell*, 129(3), 523-36.
- Shah, D. K., Zuniga-Pflucker, J. C. (2014)** An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*, 192(9), 4017-23.
- Shakib, S., Desanti, G. E., Jenkinson, W. E., Parnell, S. M., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2009)** Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells. *J Immunol*, 182(1), 130-7.
- Shinohara, T., Honjo, T. (1996)** Epidermal growth factor can replace thymic mesenchyme in induction of embryonic thymus morphogenesis in vitro. *Eur J Immunol*, 26(4), 747-52.
- Shores, E. W., Van Ewijk, W., Singer, A. (1991)** Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol*, 21(7), 1657-61.
- Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L., Handgretinger, R. (2005)** Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*, 174(10), 6477-89.
- Siggs, O. M., Makaroff, L. E., Liston, A. (2006)** The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol*, 18(2), 175-83.
- Siu, G., Clark, S. P., Yoshikai, Y., Malissen, M., Yanagi, Y., Strauss, E., Mak, T. W., Hood, L. (1984)** The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell*, 37(2), 393-401.

- Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R., Hanahan, D. (1997)** Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol*, 9(9), 1355-65.
- Soza-Ried, C., Bleul, C. C., Schorpp, M., Boehm, T. (2008)** Maintenance of thymic epithelial phenotype requires extrinsic signals in mouse and zebrafish. *J Immunol*, 181(8), 5272-7.
- Steinberg, Z., Myers, C., Heim, V. M., Lathrop, C. A., Rebustini, I. T., Stewart, J. S., Larsen, M., Hoffman, M. P. (2005)** FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*, 132(6), 1223-34.
- Su, D. M., Manley, N. R. (2000)** Hoxa3 and pax1 transcription factors regulate the ability of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development. *J Immunol*, 164(11), 5753-60.
- Su, D. M., Navarre, S., Oh, W. J., Condie, B. G., Manley, N. R. (2003)** A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation. *Nat Immunol*, 4(11), 1128-35.
- Sun, L., Guo, J., Brown, R., Amagai, T., Zhao, Y., Su, D. M. (2010)** Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell*, 9(3), 347-57.
- Sun, L., Luo, H., Li, H., Zhao, Y. (2013)** Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation. *Protein Cell*, 4(5), 342-55.
- Sun, L., Li, H., Luo, H., Zhao, Y. (2014)** Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *Biomed Res Int*, 2014(206929).
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y. R., Sunshine, M. J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R. E., Littman, D. R. (2000)** Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science*, 288(5475), 2369-73.
- Suniara, R. K., Jenkinson, E. J., Owen, J. J. (2000)** An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med*, 191(6), 1051-6.
- Takeichi, M. (1988)** The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102(4), 639-55.
- Tanaka, H., Taniuchi, I. (2014)** The CD4/CD8 lineages: central decisions and peripheral modifications for T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 373(113-29).
- Thevenaz, P., Ruttimann, U. E., Unser, M. (1998)** A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process*, 7(1), 27-41.
- Thomas, L. R., Cobb, R. M., Oltz, E. M. (2009)** Dynamic regulation of antigen receptor gene assembly. *Adv Exp Med Biol*, 650(103-15).

- Tsai, P. T., Lee, R. A., Wu, H. (2003)** BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood*, 102(12), 3947-53.
- Tsukamoto, N., Itoi, M., Nishikawa, M., Amagai, T. (2005)** Lack of Delta like 1 and 4 expressions in nude thymus anlagen. *Cell Immunol*, 234(2), 77-80.
- Tucker, A. S. (2007)** Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol*, 18(2), 237-44.
- Ucar, A., Ucar, O., Klug, P., Matt, S., Brunk, F., Hofmann, T. G., Kyewski, B. (2014)** Adult Thymus Contains FoxN1(-) Epithelial Stem Cells that Are Bipotent for Medullary and Cortical Thymic Epithelial Lineages. *Immunity*, 41(2), 257-69.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L., Takahama, Y. (2004)** CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med*, 200(4), 493-505.
- Urban, J. A., Brugmann, W., Winandy, S. (2009)** Cutting Edge: Ikaros null thymocytes mature into the CD4 lineage with reduced TCR signal: A study using CD3{zeta} immunoreceptor tyrosine-based activation motif transgenic mice. *J Immunol*, 182(7), 3955-9.
- Van Ewijk, W., Shores, E. W., Singer, A. (1994)** Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today*, 15(5), 214-7.
- Van Ewijk, W., Wang, B., Hollander, G., Kawamoto, H., Spanopoulou, E., Itoi, M., Amagai, T., Jiang, Y. F., Germeraad, W. T., Chen, W. F., Katsura, Y. (1999)** Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol*, 11(1), 57-64.
- Van Ewijk, W., Hollander, G., Terhorst, C., Wang, B. (2000)** Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets. *Development*, 127(8), 1583-91.
- Van Vliet, E., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Owen, J. J., Van Ewijk, W. (1985)** Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur J Immunol*, 15(7), 675-81.
- Varas, A., Hager-Theodorides, A. L., Sacedon, R., Vicente, A., Zapata, A. G., Crompton, T. (2003)** The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol*, 24(4), 197-206.
- Venanzi, E. S., Gray, D. H., Benoist, C., Mathis, D. (2007)** Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected. *J Immunol*, 179(9), 5693-700.
- Villaseñor, A., Chong, D. C., Henkemeyer, M., Cleaver, O. (2010)** Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*, 137(24), 4295-305.

- Viret, C., Lamare, C., Guiraud, M., Fazilleau, N., Bour, A., Malissen, B., Carrier, A., Guerder, S. (2011) Thymus-specific serine protease contributes to the diversification of the functional endogenous CD4 T cell receptor repertoire. *J Exp Med*, 208(1), 3-11.
- Vroegindeweij, E., Crobach, S., Itoi, M., Satoh, R., Zuklys, S., Happe, C., Germeraad, W. T., Cornelissen, J. J., Cupedo, T., Hollander, G. A., Kawamoto, H., Van Ewijk, W. (2010) Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium. *Mol Immunol*, 47(5), 1106-13.
- Walker, J. L., Menko, A. S., Khalil, S., Rebustini, I., Hoffman, M. P., Kreidberg, J. A., Kukuruzinska, M. A. (2008) Diverse roles of E-cadherin in the morphogenesis of the submandibular gland: insights into the formation of acinar and ductal structures. *Dev Dyn*, 237(11), 3128-41.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., Georgopoulos, K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*, 5(6), 537-49.
- Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, H. S., Peterson, P. (2012) Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front Immunol*, 3(March), 19.
- Weerkamp, F., Pike-Overzet, K., Staal, F. J. (2006) T-sing progenitors to commit. *Trends Immunol*, 27(3), 125-31.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A., Bravo, R. (1995) Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell*, 80(2), 331-40.
- White, A. J., Withers, D. R., Parnell, S. M., Scott, H. S., Finke, D., Lane, P. J., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2008) Sequential phases in the development of Aire-expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. *Eur J Immunol*, 38(4), 942-7.
- White, A. J., Nakamura, K., Jenkinson, W. E., Saini, M., Sinclair, C., Seddon, B., Narendran, P., Pfeffer, K., Nitta, T., Takahama, Y., Caamano, J. H., Lane, P. J., Jenkinson, E. J., Anderson, G. (2010) Lymphotoxin signals from positively selected thymocytes regulate the terminal differentiation of medullary thymic epithelial cells. *J Immunol*, 185(8), 4769-76.
- Wilson, A., Pircher, H., Ohashi, P., Macdonald, H. R. (1992) Analysis of immature (CD4-CD8-) thymic subsets in T-cell receptor alpha beta transgenic mice. *Dev Immunol*, 2(2), 85-94.

- Williams, J. A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M. J., Choudhury, B., Sharrow, S. O., Granger, L., Adams, A., Eckhaus, M. A., Jenkinson, S. R., Richie, E. R., Gress, R. E., Takahama, Y., Hodes, R. J. (2014)** Thymic medullary epithelium and thymocyte self-tolerance require cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L costimulatory pathways. *J Immunol*, 192(2), 630-40.
- Wong, K., Lister, N. L., Barsanti, M., Lim, J. M., Hammett, M. V., Khong, D. M., Siatskas, C., Gray, D. H., Boyd, R. L., Chidgey, A. P. (2014)** Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep*, 8(4), 1198-209.
- Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S. P., Aleksander, I., Mak, T. W. (1984)** A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*, 308(5955), 145-9.
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., Matsumoto, M. (2008)** Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med*, 205(12), 2827-38.
- Zamisch, M., Moore-Scott, B., Su, D. M., Lucas, P. J., Manley, N., Richie, E. R. (2005)** Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J Immunol*, 174(1), 60-7.
- Zhang, B., Wang, Z., Ding, J., Peterson, P., Gunning, W. T., Ding, H. F. (2006)** NF-kappaB2 is required for the control of autoimmunity by regulating the development of medullary thymic epithelial cells. *J Biol Chem*, 281(50), 38617-24.
- Zhu, M., Chin, R. K., Christiansen, P. A., Lo, J. C., Liu, X., Ware, C., Siebenlist, U., Fu, Y. X. (2006)** NF-kappaB2 is required for the establishment of central tolerance through an Aire-dependent pathway. *J Clin Invest*, 116(11), 2964-71.
- Zook, E. C., Krishack, P. A., Zhang, S., Zeleznik-Le, N. J., Firulli, A. B., Witte, P. L., Le, P. T. (2011)** Overexpression of Foxn1 attenuates age-associated thymic involution and prevents the expansion of peripheral CD4 memory T cells. *Blood*, 118(22), 5723-31.
- Zou, D., Silvius, D., Davenport, J., Grifone, R., Maire, P., Xu, P. X. (2006)** Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev Biol*, 293(2), 499-512.

Summary

DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION OF THYMIC EPITHELIUM

INTRODUCTION

The thymus is a primary lymphoid epithelial organ specialized in the generation and maintenance of the functionally mature T lymphocytes. The two principal epithelial lineages of the thymus, cTECs, involved in early T differentiation and positive selection, and mTECs, involved in the generation of central tolerance by expressing and presenting self-antigens to the developing thymocytes, constitute the two classical compartments of the thymus, cortex and medulla [1, 2]. Histological differentiation between these two compartments is evident, with clear morphological and phenotypic differences between cTECs and mTECs [3, 4], and both are differentiated and specialized during thymus development.

Currently, two stages in the maturation of thymic primordium are considered. In a first stage, or early organogenesis, independent of FoxN1 expression, the thymus-parathyroid common primordium arises as an evagination of the endodermal layer of the third pharyngeal pouch [5, 6]. The transcription factor, forkhead box protein 1 (FoxN1), makes the anterior part of this primordium commit to thymic tissue [7-10]. In a second stage, or late organogenesis, FoxN1 expression increases and differentiation to the different epithelial lineages initiates [8, 11]. E12 thymus contains thymic common TEC precursors able to differentiate into both cortex and medulla [12] but also DEC205 expressing cortical committed cells [13] and MTS10⁺ medullary committed cells [14]. These primitive medullary-committed progenitors have been described as clonally emerged islets that will evolve to constitute a confluent, single and continuous central medulla and several peripheral medullary foci, as found in the adult thymus [15, 16].

At this stage of development the first lymphoid progenitors seed the thymic primordium through the surrounding mesenchyme [17, 18] causing important changes in the organization of thymic epithelium, that evolves from a two dimensional sheet to a three-dimensional network necessary for thymocyte-epithelium interaction and crosstalk [19]. The surrounding mesenchyme, developed from the mesoderm and neural crest cells, is internalized generating thymic trabeculae [20]. However, neither the arrival of lymphoid cells nor the entry of mesenchyme seems to affect the initial

TEC cortex-medulla differentiation [21, 22] although thymocytes are known to mediate TECs maturation.

In the absence of FoxN1 expression, a cystic epithelial rudiment is generated [23], unable of being colonized by lymphoid precursors and where there is no functional differentiation of the different populations of thymic epithelium. Evidence suggest that thymic developmental program can be initiated by FoxN1 expression [24] in bipotent TECs progenitors that are able to give rise to both cortical and medullary committed progenitors. This process has been so far considered a symmetrical differentiation in which common precursors give rise simultaneously to cortical and medullary committed progenitors [25]. However, some medullary markers are expressed even in the absence of FoxN1 [26] and recent evidence accumulates indicating that progenitors gradually acquire cTEC lineage markers, prior to their commitment to the mTEC differentiation pathway and an asymmetric differentiation model begins to be considered [25].

The signals or mechanisms driving both the developmental pattern of thymic epithelium and its differentiation, including cortex-medulla organization, therefore, remain unknown. We recently found that thymic primordium appears as a stratifying bud with a branched central lumen lined by claudin (Cld)3/4⁺K5⁺ cells. After thymus growth and lobulation, these Cld3/4⁺k5⁺ cells form a continuous branched structure that increases its length and branching degree. Within it, the presence of luminal structures can be distinguished, even at E13.5. The medullary marker mouse thymic stroma 10 (MTS10) is upregulated in these Cld3/4⁺ lumen forming cells in a proximal-distal sequence. So we proposed that thymus organogenesis is based on or contains elements of a branching morphogenesis developmental pattern in which cells in the centre of an epithelial mass polarize and line up into cord-like structures, acquire apical-basal polarity, and begin to establish junctional complexes to form a series of initially discontinuous lumina and microlumina that would eventually coalesce to become a continuous lumen. These Cld3/4⁺ cells, capable of forming the novo lumina, will develop the thymic medulla. However, neither the medullary cells develop finally as a definitive lumen nor does the surrounding bud rearrange into a tubular structure with terminal end buds, acines or other differentiated distal structures, but instead remains as a concentric structure in which the medullary core does not present an

apparent lumen and is surrounded by thymic cortex. This implies that the specific differentiation program of the thymus would overlap this basic branching morphogenesis pattern modifying it presumably by the expression of FoxN1 and arrival of the first lymphoid precursors. Accordingly, nude (FoxN1^{-/-}) mouse thymus develops into a tubular branched structure in which both ductal and acinar components can be distinguished [27] or in the case of thymocyte deficiency [28-30] the presence of luminal or cystic structures becomes more evident. Thus, this luminal arrangement of medullary cells has been described as a default pathway of epithelial differentiation in the absence of thymocytes [30].

OBJECTIVES

According to our previous observations, we hypothesized that the onset and outgrowth of thymic primordium is initially based on a branching morphogenesis process that is modified by a thymic specific program triggered and driven by FoxN1 expression and the presence of lymphoid precursors. To test this hypothesis, in the present study we use a gain of function approach to analyze:

1. *Nude* mice thymus development as a model in which thymic epithelium develops in the absence of both FoxN1 ^{-/-} and lymphoid precursors.
2. The effects of FoxN1 expression on this basic epithelial pattern, by analyzing alymphoid thymus development in *NSG* and fetal *Ikaros* ^{-/-} mice models.
3. The effects of the presence of lymphoid cells upon this thymic alymphoid structure, analyzing postnatal thymus *Ikaros* ^{-/-} , which is colonized by lymphoid precursors at a postnatal stage.
4. The development of *wildtype* thymus, in which FoxN1 expression and the presence of lymphoid precursors takes place simultaneously instead of sequentially, comparatively with the former models.

RESULTS AND DISCUSSION

Our results show that FoxN1 thymus development takes place according to a branching morphogenesis and lumen formation process that renders a tubular continuous structure very similar to that followed by other epithelial organs as pancreas or salivary gland. [31, 32] This mechanism of tubulogenesis implies that the cells in the center of an epithelial mass that initially do not have a lumen or has a small initial central lumen upregulate Cld3/4 expression and polarize to form a series of

initially discontinuous lumina and microlumina that finally coalesce to become a continuous and ramified central lumen as the whole epithelial structure grows and branches. As lumen formation takes place and more cells in the intermediate layers are incorporated to the growing lumen, the epithelial structure de-stratifies.

An initial step of lumen formation means apical differentiation of cells that upregulate Cld3/4, K5 and MTS10 and arrange as a branched structure around the central lumen resulting from the evagination of the pharyngeal endoderm. These initial steps are quite conserved in all analyzed models and *wt* thymic primordia retain the ability to develop a branched lumen in vitro. However, FoxN1 expression in *NSG* and *Ikaros*^{-/-} alymphoid thymuses prevents the proceeding of apical differentiation and lumen formation beyond 15dpc. In these models, cells in the intermediate layers upregulate K5 and MTS10 but not Cld3/4 expression, preventing the formation of a continuous lumen and epithelium de-stratification around it, what results in a more thickened thymic structure with discontinuous luminal foci. Therefore, our results show that FoxN1 expression inhibits lumen formation and tubulogenesis in thymus, what is supported by the fact that enhanced FoxN1 expression in other tubular epithelium [33] produce a similar phenotype. Our results also show that FoxN1 expression is sufficient to induce the expression of the thymic functional markers MHCII or DEC205 on Cld3/4 negative areas. However no medullary specific functional markers as CD80 or Aire are found in alymphoid thymi. During fetal ontogeny of alymphoid thymuses (*NSG* and *Ikaros*^{-/-}), MHCII and the cortical marker DEC205 are expressed in most thymic epithelium except in the Cld3/4⁺ apical cells. As thymus development proceeds, cells around Cld3/4⁺ cells upregulate MTS10 as a part of their apical differentiation program, DEC205 expression is finally lost in these MTS10 and K5 positive peripheral halo around Cld3/4⁺ areas. These results support a serial asymmetric cortex-medulla differentiation pathway, wherein at least part of the thymic medulla derives from cells that have expressed cortical markers, such as DEC205 [25]. Therefore, our results imply that cortex/medulla commitment is based on a tubulogenesis program in which lumen formation is inhibited by FoxN1 expression that, at the same time, triggers a cortical differentiation program. An antagonistic equilibrium between apical and cortical differentiation determines this commitment. The absence of cortical epithelial genes in Cld3/4⁺ areas and the absence of all of

them, except MHCII, in its MTS10+ peripheral halo, that have initiated or advanced more in an apical differentiation, determine the compromise with the medullary lineage, while the rest of the epithelium, DEC205+MHCII+, without apical differentiation, constitutes the thymic cortex.

The analysis of postnatal *Ikaros* ^{-/-} and *wt* mice revealed that the presence of lymphoid precursors within the thymus triggers the expression of Aire in Cld3/4+ cells and CD80 in both Cld3/4+ and Cld3/4-MTS10+ cells. Therefore medullary commitment takes place in the presence of FoxN1, by default, as non-cortical commitment, in cells that initiate an apical differentiation program, but a lymphoid cell population is necessary to initiate a medullary functional program. LTis or V γ 5⁺ have been pointed to promote the appearance of Aire+ cells by activating RANK-NF κ B pathway but participation of other cell types cannot be discarded. The presence of lymphoid cells also induces epithelium three-dimensionalization. In early stages of *wt* thymus development a higher degree of luminal differentiation than in alymphoid thymus is observed, what implies that lymphoid cells also influence lumen formation in an opposite direction to Foxn1. This enhancement of lumen formation initiation by the presence lymphoid cells must account for the influence of thymocytes on thymic medulla continuity as has been previously been described [15, 34].

CONCLUSIONS

Our results show that Nude thymic epithelium, in the absence of FoxN1 and lymphoid precursors, develops according to a genetic program of tubulogenesis and branching morphogenesis, based on an apical differentiation. Thymic structure is based on an inhibition of the tubulogenesis program induced by FoxN1 expression, which partially inhibits apical differentiation, preventing Cld3/4 upregulation but allowing the upregulation of other apical markers, like MTS10 y K5. FoxN1 expression also induces a thymic cortical differentiation program, independent lymphoid cells presence, whose balance with the apical differentiation program determines cortex/medulla commitment. Cld3/4+ cells and its periphery MTS10+, which initiate an apical differentiation commit to the medullary lineage, while the rest DEC205+MHCII+, with no apical differentiation, commit to the cortical lineage. At least, part of medullary cells derive from TECs DEC205+, which, during development, positively regulates MTS10 expression and negatively DEC205, therefore, cortex/medulla differentiation

occurs according to an asymmetric differentiation pathway. In the presence of lymphoid precursors, Cld3/4⁺ cells acquire Aire expression, and them and MTS10⁺Cld3/4⁻ surrounding cells, acquire CD80 expression. So, thymic medulla differentiation depends on the presence of lymphoid precursors. In wt thymus, both Foxn1 expression and lymphoid precursors entrance act simultaneously, and the expression of thymic epithelial markers during ontogeny occurs in a proximal-distal direction as lumen formation advances.

1. Nitta, T., et al., *Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation*. Adv Immunol, 2008. **99**: p. 59-94.
2. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.
3. Klug, D.B., et al., *Interdependence of cortical thymic epithelial cell differentiation and T-lineage commitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11822-7.
4. Gray, D.H., A.P. Chidgey, and R.L. Boyd, *Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry*. J Immunol Methods, 2002. **260**(1-2): p. 15-28.
5. Manley, N.R. and C.C. Blackburn, *A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from?* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 225-32.
6. Gordon, J., et al., *Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 546-53.
7. Balciunaite, G., et al., *Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1102-8.
8. Gordon, J., et al., *Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch*. Mech Dev, 2001. **103**(1-2): p. 141-3.
9. Manley, N.R. and B.G. Condie, *Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **92**: p. 103-20.
10. Tsai, P.T., R.A. Lee, and H. Wu, *BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis*. Blood, 2003. **102**(12): p. 3947-53.
11. Blackburn, C.C. and N.R. Manley, *Developing a new paradigm for thymus organogenesis*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 278-89.
12. Rossi, S.W., et al., *Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 988-91.
13. Shakib, S., et al., *Checkpoints in the development of thymic cortical epithelial cells*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 130-7.
14. Hamazaki, Y., et al., *Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin*. Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 304-11.
15. Irla, M., et al., *Three-dimensional visualization of the mouse thymus organization in health and immunodeficiency*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 586-96.
16. Rodewald, H.R., et al., *Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 763-8.
17. Itoi, M., et al., *Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage*. Int Immunol, 2001. **13**(9): p. 1203-11.
18. Masuda, K., et al., *Thymic anlage is colonized by progenitors restricted to T, NK, and dendritic cell lineages*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2525-32.
19. Manley, N.R., *Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation*. Semin Immunol, 2000. **12**(5): p. 421-8.

20. Foster, K., et al., *Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus*. Journal of Immunology, 2008. **180**(5): p. 3183-9.
21. Jenkinson, W.E., E.J. Jenkinson, and G. Anderson, *Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 325-32.
22. Jenkinson, W.E., et al., *Development of functional thymic epithelial cells occurs independently of lymphostromal interactions*. Mech Dev, 2005. **122**(12): p. 1294-9.
23. Bleul, C.C. and T. Boehm, *Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3371-9.
24. Bredenkamp, N., C.S. Nowell, and C.C. Blackburn, *Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor*. Development, 2014. **141**(8): p. 1627-37.
25. Alves, N.L., et al., *Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments*. Eur J Immunol, 2014. **44**(1): p. 16-22.
26. Nowell, C.S., et al., *Foxn1 regulates lineage progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence*. PLoS Genet, 2011. **7**(11): p. e1002348.
27. Dooley, J., et al., *Nude thymic rudiment lacking functional foxn1 resembles respiratory epithelium*. Dev Dyn, 2005. **233**(4): p. 1605-12.
28. van Ewijk, W., et al., *Stepwise development of thymic microenvironments in vivo is regulated by thymocyte subsets*. Development, 2000. **127**(8): p. 1583-91.
29. van Ewijk, W., et al., *Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D?* Semin Immunol, 1999. **11**(1): p. 57-64.
30. Vroegindeweij, E., et al., *Thymic cysts originate from Foxn1 positive thymic medullary epithelium*. Mol Immunol, 2010. **47**(5): p. 1106-13.
31. Hogan, B.L. and P.A. Kolodziej, *Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(7): p. 513-23.
32. Villaseñor, A., et al., *Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis*. Development, 2010. **137**(24): p. 4295-305.
33. Prowse, D.M., et al., *Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia*. Dev Biol, 1999. **212**(1): p. 54-67.
34. Anderson, M., S.K. Anderson, and A.G. Farr, *Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment?* Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 1105-10.

Anexo IV

3D Immunofluorescence analysis of early thymic morphogenesis and medulla development

Juan José Muñoz¹, Teresa Cejalvo¹, Esther Tobajas²,
Lucía Fanlo^{2,*}, Alfonso Cortés¹ and Agustín Gregorio Zapata²

¹Center of Cytometry and Fluorescence Microscopy, Complutense University, Madrid, Spain

and ²Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

*Current Address. Department of Oncology and Hematology, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain

Summary. The thymus represents an epithelial microenvironment specialized in the generation of T-cells. The mechanisms or signals that determine the initial differentiation of the two well distinguished histological compartments of the thymus, cortex and medulla, remain unknown. Here, we report a three-dimensional analysis of the distribution of some established thymic epithelial markers in relation to thymic anatomical development during the first steps of thymus organogenesis. In the thymic primordium, initial lumen is lined by claudin (Cld)3/4⁺K5⁺ cells, after thymus growth and lobulation they form a continuous branched structure that increases its length and branching degree. Within it, the presence of luminal structures can be distinguished, even at E13.5. The medullary marker mouse thymic stroma 10 (MTS10) is upregulated in these Cld3/4⁺ lumen forming cells in a proximal-distal sequence. This structural organisation is histologically similar to that described in other epithelial organs undergoing a branching morphogenesis process. These results indicate that the thymic medulla can be evidenced as a continuous branched structure from early stages and suggest a thymic developmental program based on or containing elements of a branching morphogenesis program modified by the presence of lymphoid cells, in which medullary epithelial cell commitment is initially determined by lumen formation.

Key words: Thymus organogenesis, Thymic epithelium, Medulla, Branching morphogenesis

Introduction

The thymus represents a unique epithelial microenvironment specialized in the generation of the peripheral T-cell pool. The two major epithelial lineages of the thymus, cortical thymic epithelial cells (cTECs), specialized in positive selection and the generation of a functional broad repertoire, and medullary thymic epithelial cells (mTECs), specialized in the generation of central tolerance by means of expressing and presenting self-antigens to the developing thymocytes (Klein et al., 2009; Takahama et al., 2010), constitute the two classically well distinguished histological compartments, cortex and medulla, and are differentiated and specialized during thymus development. Our current knowledge on development of the thymus and its compartments is fragmentary, based on independent data that do not give us a comprehensive view of the entire process.

In mice, between E9.5 and E10.5 the thymus-parathyroid common primordium arises as an evagination of the endodermal layer of the third pharyngeal pouch with the participation of ectoderm of the third pharyngeal arch and mesenchymal cells derived from neural crest, which will surround the thymic primordium at E11.5 (Blackburn and Manley, 2004). The transcription factor, forkhead box protein 1 (FoxN1), under control of bone morphogenetic protein 4 (BMP4)

Conditioned deletion of ephrinB1 and/or ephrinB2 in either thymocytes or thymic epithelial cells alters the organization of thymic medulla and favors the appearance of thymic epithelial cysts

Teresa Cejalvo · Juan J. Munoz · Esther Tobajas · David Alfaro · Javier García-Ceca · Agustín Zapata

Accepted: 6 November 2014 / Published online: 23 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Our understanding about medullary compartment, its niches composition and formation is still limited. Previous studies using EphB2 and/or EphB3 knockout mice showed an abnormal thymic development that affects mainly to the epithelial component, including the cortex/medulla distribution, thymic epithelial cell (TEC) morphology and different epithelial-specific marker expression. We have already demonstrated that the lack of ephrinB1 and/or ephrinB2, either on thymocytes or on TECs, alters the cell intermingling processes necessary for thymus organization and affect cortical TEC subpopulations. In the present work, we have used the Cre–LoxP model to selectively delete ephrinB1 and/or ephrinB2 in thymocytes ($EfnB1^{thy/thy}$, $EfnB2^{thy/thy}$, $EfnB1^{thy/thy}EfnB2^{thy/thy}$ mice) or TECs ($EfnB1^{tec/tec}$, $EfnB2^{tec/tec}$, $EfnB1^{tec/tec}EfnB2^{tec/tec}$ mice) and have analyzed their role on the medullary compartment. In all the studied mutants, medullary areas are smaller and more compact than in the wt thymuses. In most of them, we observe abundant big cysts and a higher proportion of UEA^{hi}MTS10[−] cells than in wt mice, which are often forming small cysts. On $EfnB1^{tec/tec}EfnB2^{tec/tec}$, changes

affecting organ size and medullary compartment start at perinatal stage. Our data shed some light on knowledge about wt medulla histological structure and cysts meaning and formation process and on the role played by ephrinB in them.

Keywords Thymic epithelial cells · Medulla · Eph–ephrin · Cysts

Introduction

Competent T cell generation is possible thanks to the migration of lymphoid progenitors through the thymic parenchyma that facilitates their interaction with different thymic microenvironments (Anderson and Takahama 2012). Recently, there has been an increase in information that highlights the relevance of thymic microenvironments (Calderon and Boehm 2012). With regard to their generation, the symmetric model assumed until recently, in which a common epithelial cell progenitor gives rise to two different progenitors committed to either cortical or medullary epithelium, is currently questioned. Recent evidence supports that Ulex Europaeus Agglutinin-1⁺ (UEA⁺) cells could be derived from thymic epithelial cell (TECs) that express $\beta 5t$, a specific proteosome unit (Ohigashi et al. 2013), which is highly expressed on adult cortical TECs (cTECs), but not on medullary TECs (mTECs). It has also been demonstrated that AIRE-expressing mTECs could be generated upon transplantation of CD205-expressing cell progenitors (Baik et al. 2013) and IL7⁺ TECs, most of them expressing CD205 and Ly51, are capable to differentiate to both Ly51⁺ CD205⁺ cTECs and CD80⁺ mTECs (Alves et al. 2014; Ribeiro et al. 2014). These data support the possibility of mTEC development as a secondary

Teresa Cejalvo and Juan J. Munoz have contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00418-014-1296-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Cejalvo · J. J. Munoz
Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

E. Tobajas · D. Alfaro · J. García-Ceca · A. Zapata (✉)
Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain
e-mail: zapata@bio.ucm.es

Ephrin-B–Dependent Thymic Epithelial Cell–Thymocyte Interactions Are Necessary for Correct T Cell Differentiation and Thymus Histology Organization: Relevance for Thymic Cortex Development

Teresa Cejalvo,* Juan J. Munoz,* Esther Tobajas,[†] Lucía Fanlo,[†] David Alfaro,[†] Javier García-Ceca,[†] and Agustín Zapata[†]

Previous analysis on the thymus of erythropoietin-producing hepatocyte kinases (Eph) B knockout mice and chimeras revealed that Eph-Eph receptor–interacting proteins (ephrins) are expressed both on T cells and thymic epithelial cells (TECs) and play a role in defining the thymus microenvironments. In the current study, we have used the Cre-LoxP system to selectively delete ephrin-B1 and/or ephrin-B2 in either thymocytes (EfnB1^{thy/thy}, EfnB2^{thy/thy}, and EfnB1^{thy/thy}EfnB2^{thy/thy} mice) or TECs (EfnB1^{tec/tec}, EfnB2^{tec/tec}, and EfnB1^{tec/tec}EfnB2^{tec/tec} mice) and determine the relevance of these Eph ligands in T cell differentiation and thymus histology. Our results indicate that ephrin-B1 and ephrin-B2 expressed on thymocytes play an autonomous role in T cell development and, expressed on TECs, their nonautonomous roles are partially overlapping. The effects of the lack of ephrin-B1 and/or ephrin-B2 on either thymocytes or TECs are more severe and specific on thymic epithelium, contribute to the cell intermingling necessary for thymus organization, and affect cortical TEC subpopulation phenotype and location. Moreover, ephrin-B1 and ephrin-B2 seem to be involved in the temporal appearance of distinct cortical TECs subsets defined by different Ly51 levels of expression on the ontogeny. *The Journal of Immunology*, 2013, 190: 2670–2681.

The thymus is an epithelial-based organ that provides a unique microenvironment for the generation of functional T lymphocytes capable of efficiently reacting to foreign Ags and, at the same time, tolerating self-Ags (1). During their development, thymic epithelial cells (TECs) and developing thymocytes establish a mutual cross talk that is necessary for the functional maturation of both thymic cell components (2, 3). The unique three-dimensional architecture of the thymic epithelial network facilitates the TEC–thymocyte (T–TEC) interactions (4). The adult thymus is, therefore, the sum of different microenvironments each composed of specific cell types with different functions (5). Lymphoid progenitors mature while they are guided orderly through these niches by different signaling systems (6). Although we know that the cortical compartment is responsible

for expansion of the double-negative (DN) subpopulation as well as for positive selection (7) and that in the medullary compartment negative selection takes place (8, 9), we are still far from having a complete characterization of more specific niches contained in these two main thymic compartments.

The tyrosine kinase receptor family erythropoietin-producing hepatocyte kinases (Eph) and their ligand Eph receptor–interacting proteins (ephrins) provide positional information for cells and regulate cell-to-cell contacts, cell migration, attraction/repulsion phenomena, cell survival, and differentiation, participating in multiple morphogenetic processes (10, 11). Previous studies have demonstrated a relevant role for some members of this large family of molecules in different aspects of thymus biology. EphB2 and EphB3, and their ligands ephrin-B1 and -B2, are expressed on both thymocytes and TECs (12), and Eph B2 and/or EphB3 knockout mice showed an abnormal thymic development that affects mainly the epithelial component, including the cortex/medulla distribution, TEC morphology, and different epithelial-specific marker expression (13). They also showed decreased numbers of thymocytes and altered T differentiation particularly affecting the DN cell stage (12). Studies based on chimeras revealed that these receptors play an autonomous role both in T cell differentiation and TEC development, but they also affect nonautonomously the other thymic component (14, 15).

In the current study, we have used a Cre-LoxP model for the deletion of genes encoding for ephrin-B1 or -B2, ligands of EphB2 and EphB3, specifically either in TECs or in thymocytes, to evaluate in vivo the relevance of their expression in each thymic component on the biology of the organ for a better understanding of crosstalk. The obtained results confirm the importance of Eph–ephrins in T–TEC interactions and shed light on the characterization and development of thymic cortex microenvironments.

*Cytometry and Fluorescence Microscopy Center, Complutense University, Madrid 28040, Spain; and [†]Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid 28040, Spain

Received for publication July 12, 2012. Accepted for publication January 8, 2013.

This work was supported by Grants BFU 2007-65520 and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, RD06/0010/0003 from the Spanish Ministry of Health, Social Services and Equality, and S-BIO/0204/2006 from the Regional Government of Madrid.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Agustín Zapata, Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, C/José Antonio Nováis, sn, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: zapata@bio.ucm.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; cTEC, cortical thymic epithelial cell; DLL4, Delta-like ligand 4; DN, double-negative; DP, double-positive; E, embryonic day; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; Eph, erythropoietin-producing hepatocyte kinase; ephrin, erythropoietin-producing hepatocyte kinase receptor–interacting protein; MHC II, MHC class II; mTEC, medullary thymic epithelial cell; MTS, mouse thymic stroma; PN, postnatal day; SP, single-positive; Ta, temperature of annealing; TEC, thymic epithelial cell; T–TEC, thymocyte–thymic epithelial cell; UEA-1, *Ulex europaeus* agglutinin-1; wt, wild-type.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00